

Zum Mechanismus der Pasteurschen Reaktion

Über die aerobe Hemmung der Hexokinase-
und Phosphofructokinase-Reaktion

Joachim Spieß

—

1970

Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Physikalische
Biochemie der Universität München

Direktoren: Prof. Dr. Th. Bücher, Prof. Dr. H. G. Zachau,
Prof. Dr. M. Klingenberg

Zum Mechanismus der Pasteurschen Reaktion

Über die aerobe Hemmung der Hexokinase- und Phosphofructo-
kinase-Reaktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Joachim Spieß

aus

Lüdenscheid

1970



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte: Priv. Doz. Dr. E. Meyer
Mitberichterstatte: Prof. Dr. Th. Bücher
Dekan: Prof. Dr. E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 1970

Herrn Priv. Doz. Dr. Erich Meyer†danke ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, die zahlreichen fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, die weitgehende Förderung bei der Durchführung der Arbeit und die liebenswürdige Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Theodor Bücher, Direktor des Instituts für Physiologische Chemie der Universität München, bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die freundliche Übernahme des Correferats sehr dankbar.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
Phänomen	1
Pathologie	2
Beteiligung der Atmung	2
Resynthese von Kohlenhydrat	2
Konkurrenz um Phosphat und Adenosindiphosphat	3
Atmungskontrolle durch Adenosindiphosphat	7
Versuche mit nicht phosphorylierenden Mitochondrien	9
Pasteur-Effekt und Effektoren	10
Pasteur-Effekt und NADH-NAD^+ -Potential	16
Mechanismus des Pasteur-Effekts auf den Stufen der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion	21
METHODIK	22
Gewinnung des Versuchsmaterials	22
Inkubationsversuche	22
Extraktionsverfahren	24
Extraktanalyse	25
ERGEBNISSE	42
Aerobe Hemmung der Phosphofructokinase-Reaktion und Redoxabhängigkeit	42
Effektoren als Parameter des Pasteur-Geschehens	60
Phosphofructokinase-Reaktion und glykolytische ATP-Synthese	73
Aerobe Hemmung der Hexokinase-Reaktion	82
Redoxabhängigkeit der Hexokinase-Reaktion	85
Hexokinase-Reaktion und Effektoren	86
Hexokinase-Reaktion und glykolytische ATP-Synthese	87
DISKUSSION	90
ZUSAMMENFASSUNG	98
LITERATURVERZEICHNIS	100
LEBENS LAUF	

EINLEITUNG

Phänomen

Wenn man in Mäusehirn durch Decapitation eine Ischämie und damit Anoxie setzt, so erhält man reproduzierbar bestimmte Metabolitantworten der Glykolyse. Nach Messungen von O.H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger und D.W. Schulz (1) sinken unmittelbar nach Einsetzen der Anaerobiose Glykogen, Glucose, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat ab, während zugleich Fructosediphosphat und sämtliche glykolytischen Folgeprodukte bis auf das kaum vorhandene 1.3.-Diphosphoglycerat ansteigen. J.R. Williamson (2) bestätigt im Prinzip diese Reaktion der Glykolyse auf den Sauerstoffentzug mit isolierten perfundierten Rattenherzen, in denen er mit Kohlenmonoxyd Anoxie auslöst. Außerdem zeigt er die Reversibilität der glykolytischen Veränderungen, indem er die Herzen im Anschluß an die anaerobe Phase wieder aerob perfundiert. Die anoxisch erfolgten Konzentrationsänderungen glykolytischer Intermediate werden dann weitgehend zurückgenommen (2).

Dieses Phänomen der reversiblen Sauerstoffwirkung auf die Glykolyse heißt nach einem Vorschlag O. Warburgs (3) "Pasteur-Effekt". Die Benennung erinnert an die Arbeiten L. Pasteurs (4), der als erster im Rahmen seiner Gärungsstudien den Einfluß der Gasphase auf die Kohlensäurebildung beobachtete. Man findet den Pasteur-Effekt universell, in lebenden Zellen verschiedensten Ursprungs, so zum Beispiel in vielen Heferassen (5), in Froschmuskel (6), in Rindsmuskel (7,8), in der Nierenrinde der Ratte (9) und, wie bereits beschrieben, im Mäusehirn (1) und im Rattenherz (2).

Pathologie

Eine pathologische Störung der Pasteurschen Reaktion ist in der Tumorzelle gegeben. Insbesondere O. Warburg (10) hat häufig auf die aerobe Glykolyse von Tumorgewebe, also die dort zu findende Beseitigung des Pasteur-Effekts hingewiesen.

Nach den Untersuchungen von D.M. Regen, W.W. Davis, H.E. Morgan und C.R. Park (11) ist das Pasteur-Geschehen möglicherweise auch in der Zelle diabetischer Tiere betroffen. In isolierten, mit glucosehaltiger Lösung perfundierten Herzen alloxan-diabetischer Ratten verschwindet nämlich unter Sauerstoff deutlich weniger Glucose als in gleichbehandelten Herzen gesunder Tiere, während dieser Unterschied unter Stickstoff quantitativ weniger ausgeprägt ist (11).

Atmung

In die Kausalkette vom Sauerstoffreiz bis zur Glykolyse-Antwort ist die Atmung einbezogen. Wie O. Warburg (3) zeigt, verschwindet der Pasteur-Effekt nach selektiver Hemmung der Atmung durch Blausäure trotz der Anwesenheit des molekularen Sauerstoffs. Auch durch Kohlenmonoxydvergiftung der Atmung läßt sich der Pasteur-Effekt nach O. Warburg (12) reversibel beseitigen. Diesen Befund benutzt J.R. Williamson (2) in den erläuterten Perfusionsexperimenten. Indem er die isolierten Rattenherzen mit CO begast, verstärkt er die Wirkung des Sauerstoffentzugs durch die Blockierung der Atmung.

Resynthese von Kohlenhydrat

Nach O. Meyerhof und Mitarbeitern (5,6) wird ein Teil der glykolytisch entstehenden Milchsäure unter dem Einfluß der Sauerstoffatmung oxidiert. Mit Hilfe der dabei gewonnenen

Energie wird der übrige größere Teil der Milchsäure zu Kohlenhydrat resynthetisiert. Diese Pasteur-Meyerhof-Theorie setzt nach W. Kutscher und W. Sarreither (13) die Erholungsprozesse der Skelettmuskulatur mit der Pasteurschen Reaktion gleich.

Die Richtigkeit solcher oder ähnlicher Erklärungen, die das aerobe, glykolytische Metabolitbild auf resynthetische Vorgänge beziehen, verliert im Hinblick auf Untersuchungen A.C. Aisenbergs, B. Reinafarjes und V.R. Potters (14), sowie A.C. Aisenbergs und V.R. Potters (15) an Wahrscheinlichkeit. Die genannten Autoren berichten von Experimenten mit glykolysierendem Überstand aus Rattenhirn und isolierten Mitochondrien aus Rattenleber. Dieses System besitzt alle Kennzeichen eines Pasteur-Effekts: in Gegenwart von Glucose entsteht unter Sauerstoff deutlich weniger Lactat als unter Stickstoff; aerob verschwindet desto weniger Glucose und reichern sich desto weniger Pyruvat und Lactat an, je mehr die Mitochondrienkonzentration sich einem Sättigungswert annähert (14). Bietet man nun diesem System unter Sauerstoff bei hoher Mitochondrienkonzentration markierte Glucose-2- ^{14}C an, so taucht der Glucoseanteil, der nach der Inkubation verschwunden ist, in äquivalenter Menge als $^{14}\text{CO}_2$ wieder auf (14). Da ein Zusatz von unmarkiertem Fructosediphosphat oder Pyruvat die spezifische Aktivität des Glucose-Pools unter diesen Versuchsbedingungen nicht vermindert, kann man in diesem System resynthetische Vorgänge im Rahmen der Pasteurschen Reaktion ausschließen und stattdessen eine glykolytische Hemmwirkung der Sauerstoffatmung annehmen (15).

Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die intakte tierische Zelle findet keine Widersprüche in der Literatur.

Konkurrenz um Phosphat und Phosphatakzeptor

Wenn auch heute alle Arbeitsgruppen, die sich mit der Pasteur-Problematik beschäftigen, davon ausgehen, daß es

sich hier um eine hemmende Wirkung der Atmung auf den glykolytischen Abbau handelt, ist der Mechanismus, wie das geschieht, umstritten.

Nach den heutigen kinetischen Vorstellungen wird die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion durch die Aktivität des katalysierenden Enzyms und den Grad der Sättigung mit Substrat und Cosubstrat festgelegt. Demnach sind als mögliche, unmittelbare Ursachen der aeroben Hemmung der Glykolyserate im Rahmen des Pasteur-Geschehens eine Aktivitätsminderung glykolytischer Enzyme und ein Mangel an Substrat oder Cosubstrat zu erörtern.

F. Lynen (16,17) und M.J. Johnson (18) haben gleichzeitig, aber unabhängig voneinander versucht, den Pasteur-Effekt als die Folge einer Konkurrenz der Atmung und der Gärung um die von beiden Systemen benötigten Cofaktoren Adenosindiphosphat und anorganisches Phosphat zu erklären. Eine in dieser Konkurrenz überlegene Atmung könnte die cytoplasmatische Konzentration von Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat kontrollieren und dadurch die Gärungsgeschwindigkeit bestimmen.

F. Lynen (16,17,19,20) findet zahlreiche experimentelle Hinweise, die seiner Theorie des Pasteur-Effekts entsprechen.

Für eine Beteiligung des anorganischen Phosphats am Pasteur-Geschehen sprechen die unmittelbar nach Vergiftung der Atmung mit HCN beginnende Freisetzung von Phosphat in Bäckerhefe (19,20) und die gasphasenabhängigen Schwankungen im Phosphatgehalt zwischen einem hohen anaeroben und niedrigeren aeroben Niveau, die F. Lynen (16) beobachtet, wenn er verarmte Branntweinhefe in Glucose-Gegenwart abwechselnd unter Sauerstoff und Stickstoff schüttelt.

Dagegen bleibt der Adenosindiphosphatgehalt in Bäckerhefe durch einen Wechsel von Stickstoff auf Sauerstoff unbeeinflusst (20). Deswegen und im Hinblick auf die Möglichkeit

einer Harden-Young-Gärung, die die glykolytische Bilanz von Verbrauch und Bildung von Adenosindiphosphat in Glucose-Gegenwart durch Fructosediphosphat-Anreicherung ausgleichen könnte (21), hält F. Lynen (20) eine Kontrolle der Gärungsgeschwindigkeit durch Adenosindiphosphat im Rahmen der Pasteurschen Reaktion für wenig wahrscheinlich.

Die überlegene Position der Atmung gegenüber der Gärung im Phosphatentzug äußert sich nach Experimenten F. Lynens und R. Koenigsbergers (19) darin, daß atmende Hefe anorganisches Phosphat schneller als nicht atmende bindet.

Den primären Angriffsort des Pasteur-Effekts im glykolytischen System stellt nach F. Lynen (16,20) die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion dar, deren Geschwindigkeit nach seiner ursprünglichen Auffassung (16) den "Totalumsatz des Kohlenhydrats" (16) bestimmt. Unter Hinweis auf die kinetischen Messungen O. Warburgs und W. Christians (22) bezieht F. Lynen (16,20) die Größe der Geschwindigkeit dieser Reaktion auf die gasphasenabhängigen Phosphatschwankungen. In der Muskelzelle erfolgt nach seiner Meinung (17) die unmittelbare Kontrolle durch Phosphat im Rahmen des Pasteur-Geschehens möglicherweise bereits auf der Stufe der Glykogenphosphorolyse.

Nach dem Studium des Verhaltens der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion ergänzt F. Lynen (20) seine ursprünglichen Vorstellungen durch die Annahme einer Beteiligung von Strukturfaktoren am Pasteur-Geschehen. Die aerobe Hemmung der Glucose- und Fructose-6-phosphat-Phosphorylierung, die sich in Hefe wie in tierischen Geweben (11) in einer aeroben Verminderung des Glucoseverbrauchs und in einer Anhäufung von Glucose-6-phosphat beim Wechsel von Stickstoff auf Sauerstoff äußert (20), erklärt er als Folge eines Adenosintriphosphatmangels am Reaktionsort. Daß für diesen Cosubstratmangel die oxidierende Gärungsreaktion nur zum Teil verantwortlich ist, ergibt sich nach

F. Lynen (20) aus der Chronologie der Metabolitantworten aerob inkubierter Bäckerhefe auf die Vergiftung der Atmung durch HCN. Während der Glucose-6-phosphat-Gehalt sofort nach Aussetzen der Atmung absinkt und sich auf ein niedrigeres stationäres Niveau einstellt, bleibt der Fructosediphosphatgehalt über ein kurzes Zeitintervall konstant und steigt erst dann an (20). Dieses metabolische Verhalten interpretiert F. Lynen (20) als eine kurzzeitige Verminderung der Hexokinase-Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Phosphofructokinase-Reaktionsgeschwindigkeit. Demnach wirkt sich die Ausschaltung der Atmung unmittelbar nur auf die Phosphorylierung von Glucose, nicht aber auf diejenige von Fructose-6-phosphat aus. F. Lynen (20) schlußfolgert daraus, daß die Hexokinase-Reaktion im Gegensatz zur Phosphofructokinase-Reaktion nicht nur das glykolytisch synthetisierte, sondern auch das durch die Atmung gebildete Adenosintriphosphat verwerten kann. Die unterschiedliche Verfügbarkeit über das mitochondriale Adenosintriphosphat versteht er (20) als Ausdruck cytoplasmatischer Kammerung.

Nach diesen Vorstellungen kontrolliert also die glykolytische Adenosintriphosphatsyntheserate die Geschwindigkeit der Phosphofructokinase-Reaktion völlig, die der Hexokinase-Reaktion aber nur zum Teil. Daß überhaupt noch auf der Stufe der Glucosephosphorylierung trotz der Bereitstellung von Cosubstrat durch die Atmung ein Pasteur-Effekt auftritt, deutet F. Lynen (20) als Adenosintriphosphat-"Transportphänomen" (20). F. Lynen und R. Koenigsberger (19) weisen auf die Möglichkeit einer mitochondrialen Retention des Adenosintriphosphats hin. Tatsächlich haben B. Hess und B. Chance (23) eine Retention dieses Nucleotids durch Mitochondrien mit Ascites-Tumor-Gewebe der Maus nachgewiesen. Im Cytoplasma von Zellen, deren Atmung sich in einem aktiven und phosphorylierenden Zustand befindet, messen sie eine niedrigere Adenosintriphosphatkonzentration als in den Mitochondrien dieser Zellen.

Da F. Lynen (20) davon ausgeht, daß anorganisches Phosphat, Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat intrazellulär kompartimentiert sind, gibt ihm die chemische Analyse der Gehalte dieser Cofaktoren nur begrenzten Aufschluß hinsichtlich der Konzentrationsverhältnisse an den glykolytischen Reaktionsorten. Deswegen versuchen F. Lynen und R. Koenigsberger (19), die Richtigkeit ihrer Vorstellungen auch durch unmittelbaren gezielten Eingriff in das dynamische Geschehen nachzuweisen, indem sie nämlich die Konkurrenz verhindern, die sonst zwischen Atmung und Gärung um Phosphat und Adenosindiphosphat besteht. Eine geeignete experimentelle Maßnahme stellt die Entkopplung der Phosphorylierung vom Elektronentransport der Atmung dar. Tatsächlich erhöht die Entkoppler-Substanz 2.4.-Dinitrophenol in einem definierten Konzentrationsbereich die aerobe Gärung der Bäckerhefe auf anaerobe Werte, ohne den Sauerstoffverbrauch zu hemmen. Die Interpretation der Versuche mit 2.4.-Dinitrophenol ist allerdings im Hinblick auf die konzentrationsabhängigen, verschiedenartigen, aktivierenden und hemmenden Wirkungen dieser Substanz nach E. Meyer (24) problematisch.

Atmungskontrolle durch Adenosindiphosphat

F. Lynen und Mitarbeiter (16,17,19,20) zeigen eine Möglichkeit, wie die Atmung die Glykolyse beherrschen könnte. Geht man von ihren Vorstellungen aus, so ist anzunehmen, daß jede Veränderung der Atmungsaktivität, von der auch die Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung betroffen ist, den Pasteur-Effekt beeinflusst. Insofern sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von B. Chance und Mitarbeitern (25,26, 27,28,29,30) interessant, denn sie enthalten Hinweise darauf, wie die Regulation der Atmungsaktivität erfolgen könnte.

B. Chance (26) untersucht die Affinität verschiedener Stoffe gegenüber der Atmung isolierter Mitochondrien und intakter Zellen. Veränderungen des Aktivitätszustandes der Atmung

lassen sich sowohl durch Bestimmung der Sauerstoffrate mit polarographischen Methoden nach B. Chance und G.R. Williams (27) als auch mit Hilfe von spektrophotometrischen Messungen beobachten, die nach B. Chance (28) charakteristische, von der Art des Zusatzstoffes abhängige Potentialverschiebungen der Atmungsträger zeigen. So beantworten isolierte Mitochondrien verschiedenen Ursprungs nach B. Chance (26) einen Zusatz von Adenosindiphosphat nicht nur mit einer Beschleunigung der Sauerstoffrate, sondern zugleich mit einer Positivierung des intramitochondrialen Pyridindinucleotidpotentials und einer Negativierung des Cytochrom-a-Potentials. Daß Sauerstoffrate und Redoxpotential nach Verbrauch des zugegebenen Phosphatakzeptors auf ihre Ausgangswerte zurückkehren, identifiziert Adenosindiphosphat nach B. Chance (26) als Kontrollsubstanz der Atmung.

B. Chance und C.M. Connelly (29) benutzen die spektrophotometrisch meßbaren Verschiebungen in dem Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Pyridindinucleotid als Indikator zur Bestimmung der Affinität von Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat gegenüber der Atmung isolierter Mitochondrien. Einen halbmaximalen Effekt finden sie bei $5,6 \cdot 10^{-5}$ M Adenosindiphosphat oder 10^{-3} M Phosphat (29). Auf der Basis dieser unterschiedlichen Affinität erfolgt die Antwort der Atmung auf Adenosindiphosphat schnell, auf Phosphat dagegen langsam (26). Somit erfüllt Adenosindiphosphat im Gegensatz zu Phosphat die Kriterien einer "Trigger"-Substanz der Atmung, die B. Chance (26) so zusammenfaßt: "A desirable characteristic of a respiratory control chemical is that it be capable of triggering the system on and off by small changes in its concentration."

Auch in intakten Zellen von Ascites-Tumor der Maus und Bäckerhefe findet Atmungskontrolle durch Adenosindiphosphat statt. B. Chance und B. Hess (25), sowie B. Chance und G.R. Williams (30) bieten den Zellen unter aeroben Bedingungen Glucose an und messen polarographisch und spektrophotome-

trisch eine unmittelbare Atmungsaktivierung. Die spektrophotometrisch beobachteten Potentialverschiebungen entsprechen denjenigen, die in isolierten Mitochondrien aus tierischen Geweben nach Adenosindiphosphat-Zusatz auftreten (25, 26, 30). Deswegen führen B. Chance und B. Hess (25), sowie B. Chance und G.R. Williams (30) die Atmungsaktivierung in intakten Zellen unmittelbar nach Glucose-Zusatz auf die Freisetzung von Adenosindiphosphat durch die Hexokinase-Reaktion zurück.

Die Phase hoher Atmungsaktivität und schnell ablaufender Glucosephosphorylierung wird von einer beide Vorgänge betreffenden Hemmphase abgelöst (25, 30). Auf eine Erörterung dieses interessanten Phänomens soll hier deswegen verzichtet werden, weil der anaerobe Vergleich fehlt, so daß Deutungsversuche im Rahmen einer Behandlung des Pasteur-Geschehens problematisch sind.

Der von B. Chance und Mitarbeitern (25, 26, 30) beschriebene Befund der Atmungskontrolle durch Adenosindiphosphat läßt sich ohne weiteres mit dem von F. Lynen (20) vorgeschlagenen Mechanismus des Pasteur-Effekts vereinbaren. Es wäre denkbar, daß eine Bereitstellung von Adenosindiphosphat aerob die Atmungsaktivität erhöht und durch die daraus resultierende Senkung der cytoplasmatischen Phosphatkonzentration die Glykolyserate limitiert.

Versuche mit nicht phosphorylierenden Mitochondrien

Die Erklärung des Pasteur-Effekts als Folge einer Konkurrenz zwischen Atmung und Glykolyse um anorganisches Phosphat und Adenosindiphosphat bleibt in der Literatur nicht unwidersprochen. So kritisiert V.R. Potter (31) die Annahme F. Lynens (20), daß mitochondrial gebildetes Adenosintriphosphat unter Sauerstoff infolge cytoplasmatischer Kompartimentierung nicht an den Reaktionsort der Phosphofructokinase gelangt. Im Hinblick auf zahlreiche andere Energie benötigende Vorgänge, die im Cytoplasma

lokalisiert sind, fragt er: "Is it not necessary to make an ad hoc theory to explain how the ATP⁺), which is not in the cytoplasm as far as the phosphofructokinase is concerned, is in the cytoplasm as far as certain functions are concerned?" (31).

Im Rahmen ihrer Untersuchungen mit rekombinierten Systemen setzen A.C. Aisenberg, B. Reinafarje und V.R. Potter (14) glykolysierendem Überstand aus Rattenhirn in Gegenwart von Glucose unter Sauerstoff Mitochondrien aus Rattenleber zu, die durch Vorbehandlung nach P. Siekevitz und V.R. Potter (32) ihre Phosphorylierungsfähigkeit verloren haben. Die Atmung dieser Mitochondrien kann also nicht mehr mit der Glykolyse um Adenosindiphosphat und anorganisches Phosphat konkurrieren. Trotzdem tritt in diesem System Pasteur-Effekt auf (14). Somit ist zumindest die Universalität der Theorie F. Lynens (20) zu bezweifeln.

Pasteur-Effekt und Effektoren

Nach F. Lynen (20) kontrolliert die Atmung die Glykolyse, indem sie den Grad der Sättigung einiger glykolytischer Enzyme mit Cosubstrat bestimmt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, das Pasteur-Geschehen auf die Veränderung des Aktivitätszustandes glykolytischer Schlüsselenzyme zurückzuführen. Als Schlüsselenzyme sind in diesem Zusammenhang im Hinblick auf die Metabolitantworten in der anaerob-aeroben Übergangsphase (1,2) einige oder alle Enzyme des oberen glykolytischen Abschnitts anzusehen. Denn da die anoxische Beseitigung des Pasteur-Effekts in Mäusehirn sich in einem Absinken von Glykogen, Glucose, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, sowie in einem Anstieg von Fructosediphosphat und sämtlichen glykolytischen Folgeprodukten äußert (1), scheint die Schlußfolgerung berechtigt, daß vor allem die Geschwindigkeit der Metabolisierung von Glykogen und Glucose zu Fructosediphosphat vom Pasteur-Geschehen betroffen ist.

+) ATP = Adenosintriphosphat

Eine Veränderung der Enzymaktivitäten könnte zum Beispiel durch die Wirkung von Effektoren erfolgen. Der Mechanismus, mit dem diese Stoffe auf Enzyme wirken, ist unklar. Nach den meßtechnisch erfaßbaren Veränderungen der Enzymaktivität kann man Inhibitoren, der Hemmung entgegenwirkende De-inhibitoren, Aktivatoren und die Aktivierung vermindernde Deaktivatoren unterscheiden.

Daß Effektoren die Aktivität glykolytischer Enzyme beeinflussen, ergibt sich aus kinetischen Messungen mit isolierten, gereinigten Enzymen und mit Gewebeextrakten.

So wird Hexokinase durch Glucose-6-phosphat (33,34) und Adenosindiphosphat (35) gehemmt. Anorganisches Phosphat beseitigt die Glucose-6-phosphat-Hemmung (36). Das Hefe-enzym spricht allerdings weder im gereinigten Zustand noch im Rohextrakt auf Glucose-6-phosphat an (37).

Während sich Phosphorylase a kaum effektorisch beeinflussen läßt, wird Phosphorylase b durch Adenosin-5'-monophosphat aktiviert (38). Glucose-6-phosphat und Adenosintriphosphat beseitigen diese Antwort als Deaktivatoren (38). Die Phosphohexose-Isomerase läßt sich durch Adenosintriphosphat, Phosphoenolpyruvat, anorganisches Phosphat und 6-Phosphogluconat hemmen (39).

Die Phosphofructokinase zeigt Aktivitätsänderungen in Gegenwart der Inhibitoren Adenosintriphosphat (40), Citrat (41), Creatinphosphat (37) und Phosphoenolpyruvat (37) und in Anwesenheit der Aktivatoren Adenosindiphosphat (42,43), anorganisches Phosphat (42,43), Fructosediphosphat (42,43), Adenosin-3'-5'-monophosphat (42,43) und Adenosin-5'-monophosphat (42,43).

Die aufgeführten Aktivatoren der Phosphofructokinase und außerdem Fructose-6-phosphat besitzen deinhibitorische Wirkungen auf die Hemmung durch Adenosintriphosphat (42,43) oder Citrat (43).

Die Glucose-1-phosphat-kinase, deren Aktivität nach Ergebnissen P. Eysers und D. Pettes (44) möglicherweise über die

Syntheserate des Leloir-Esters die Geschwindigkeit der Phosphoglucomutase-Reaktion bestimmt, entspricht in ihrem kinetischen Verhalten qualitativ vollständig und quantitativ weitgehend der Phosphofructokinase.

Sollten Effektoren den Pasteur-Effekt auslösen, dann müßte man gasphasenabhängige Konzentrationsänderungen dieser Stoffe an den cytoplasmatischen Reaktionsorten erwarten. Ein solches Verhalten der Effektoren experimentell nachzuprüfen, ist deswegen schwierig, weil keine verlässliche Methode zur Verfügung steht, um metabolische Konzentrationen an den intrazellulären Reaktionsorten zu bestimmen. Andererseits ist nach T. Bücher und M. Klingenberg (45) mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die meßbaren metabolischen Gewebegehalte nicht für die Konzentrationen an den Enzymorten repräsentativ sind. Nach Ergebnissen von B. Hess und B. Chance (23), sowie W.C. Schneider, M.J. Striebich und G.H. Hogeboom (46) sind Mitochondrien, zumindest unter bestimmten Versuchsbedingungen, in der Lage, Adenosintriphosphat (23) und Citrat (47) zu retenieren. Demnach gibt es Stoffwechselsituationen, in denen die cytoplasmatische Konzentration dieser beiden Effektoren geringer als die mitochondriale ist, also die Messung des Gewebegehalts nur begrenzte Rückschlüsse auf die Konzentration an Enzymorten zuläßt.

Wenn man von der Möglichkeit einer intrazellulären Kompartimentierung der Effektoren absieht und die Metabolitantworten zugrundelegt, die man unmittelbar nach Auslösen einer Anoxie in Mäusehirn durch Analyse der Gewebegehalte findet (1,47), so erscheint bei einem Vergleich der Ergebnisse mit den an reinen Enzymen gewonnenen kinetischen Daten ein durch Effektoren ausgelöster Pasteur-Effekt durchaus realisierbar. Vor allem fällt der steile Anstieg von Fructosediphosphat auf, der nach 60 Sekunden Ischämie 400% des Ausgangswertes erreicht (1,43). Das ist deswegen erwähnenswert, weil Fructosediphosphat bereits in geringsten Konzentrationen deinhibierend auf die gereinigte Phosphofructokinase in vitro wirkt (42,43).

Die Kompartimentierungsfrage verliert in diesem Zusammenhang an Bedeutung, wenn man Beobachtungen J.V. Passonneaus und O.H. Lowrys (42), sowie A. Parmeggianis und R.H. Bowmans (41) berücksichtigt. Um das effektorische Verhalten in der aerob-anaeroben Übergangsphase in Mäusehirn (1) zu simulieren, inkubieren J.V. Passonneau und O.H. Lowry (42) gereinigte Phosphofructokinase aus Kaninchenmuskel in vitro gleichzeitig mit mehreren Effektoren, in einer Zusammensetzung, die den in-vivo-Verhältnissen entspricht. Sie finden, daß die Aktivatoren, beziehungsweise Deinhibitoren gegenseitig ihre kinetischen Wirkungen potenzieren (42).

A. Parmeggiani und R.H. Bowman (41) weisen einen entsprechenden Potenzierungseffekt für die Inhibitoren Adenosin-triphosphat und Citrat an dem gleichen Enzym aus Kaninchenmuskel nach.

Wenn geringe Konzentrationsänderungen der Effektoren über einen Verstärkermechanismus wirken, ist eine Auslösung des Pasteur-Effekts durch Effektoren selbst bei gegebener Kompartimentierung denkbar (41).

Der erläuterte Potenzierungseffekt kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß die Effektoren Trigger-Substanzen der Glykolyse sind.

Bei der Vorstellung eines Pasteur-Effekts auf der Basis effektorischer Wirkungen spielt die Phosphofructokinase eine entscheidende Rolle. Der Aktivitätszustand dieses Enzyms könnte die Glucose-6-phosphat-Konzentration festlegen und somit nach den Ergebnissen H. Weil-Malherbes und A.D. Bones (33), R.K. Cranes und A. Sols (34), K. Uyedas und E. Rackers (37), sowie H.E. Morgans und A. Parmeggianis (38) die Aktivität von Hexokinase (33,34,37) und Phosphorylase b (38) bestimmen. Mit Hilfe effektorischer Mechanismen würde demnach also die Phosphofructokinase-Aktivität die Einschleusung von Glykogen und Glucose in das glykolytische System kontrollieren.

Nach H.E. Morgan und A. Parmeggiani (38) entziehen Hormone wie Glucagon die Glykogenolyse der effektorischen Selbstregulation, indem sie eine Umwandlung von Phosphorylase b in die effektorisch unempfindliche a-Form bewirken (38,48,49).

Die Attraktivität der Annahme effektorischer Mechanismen zur Erklärung von Stoffwechselregulationen wird auch an einem Beispiel aus der Pathologie der Zelle deutlich. D.M. Regen, W.W. Davis, H.E. Morgan und C.R. Park (11) beobachteten, wie bereits erwähnt wurde, einen gegenüber der Norm verminderten Glucoseverbrauch in Herzen diabetischer Ratten. A. Parmeggiani und R.H. Bowman (41) führen dieses pathologische Verhalten auf eine gemessene Erhöhung des Citratgehalts in diabetischen Geweben zurück, die ihrerseits aus einer Aktivierung der Fettsäureoxidation resultiert. Eine Konzentrationszunahme dieses Inhibitors müßte dann auf der Grundlage eines Mechanismus, der dem diskutierten durch Effektoren verursachten Pasteur-Effekt entspräche, die Einschleusung von Glucose vermindern.

Angesichts der von vielen Autoren postulierten, wichtigen, regulativen Stellung des Enzyms Phosphofructokinase im Rahmen von Stoffwechselregulationen verdienen Untersuchungen von E. Vinuela, M.L. Salas, M. Salas und A. Sols (51) besonderes Interesse. Nach ihren Experimenten mit Rohextrakt tritt die Hefe-Phosphofructokinase, ähnlich wie die Glykogenphosphorylase (52), in zwei Formen auf. Die a-Form läßt sich im Gegensatz zu der b-Form weder durch Adenosin-triphosphat noch durch Citrat hemmen (51). Welche Konsequenzen aus dieser Beobachtung für die Hypothese effektorischer Wirkungen im Rahmen der Pasteurschen Reaktion zu ziehen sind, läßt sich zur Zeit noch nicht übersehen. Die Ergebnisse der Literatur, die für die Auslösung des Pasteur-Effekts durch Effektoren sprechen, sollen noch einmal zusammengefaßt werden:

1. Die in diesem Zusammenhang wichtigen glykolytischen Enzyme zeigen in vitro, isoliert und gereinigt, eine hohe Affinität gegenüber Effektoren.
2. Der Gewebegehalt vieler wirksamer Effektoren ändert sich gasphasenabhängig; unter Sauerstoff nimmt der Gehalt von Inhibitoren zu; derjenige von Aktivatoren sinkt ab.

3. Die effektorischen Wirkungen potenzieren sich in vitro. Ein wichtiges Glied fehlt in der Beweiskette, denn es ist bisher nicht gelungen, nachzuweisen, daß sich Enzyme in vivo so verhalten wie in vitro. Eine solche Übereinstimmung des Verhaltens ist nicht selbstverständlich. P. Özand, H.T. Narahara und C.F. Cori (53) bestimmen in vitro und in vivo die Affinität von Glucose gegenüber Froschsartorius-Hexokinase. Sie finden in vivo einen K_M -Wert, der um etwa zwei Zehnerpotenzen über dem K_M -Wert in vitro liegt. Ein ähnliches Phänomen beobachten sie hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung von Glucose-6-phosphat gegenüber Hexokinase (53). In intakten Froschsartorien reichert sich Glucose-6-phosphat anaerob an und erreicht schließlich ein stationäres Niveau, das dem fünffachen aeroben Wert entspricht. Obwohl auf der Grundlage kinetischer Messung mit Sartoriusextrakt die Hexokinase unter anaeroben Bedingungen zu 95% gehemmt sein müßte, ist die Glucosephosphorylierung gegenüber dem aeroben Versuch in Wirklichkeit deutlich beschleunigt (53). In diesem Zusammenhang ist ein Nebenfund erwähnenswert, von dem K. Uyeda und E. Racker (37) berichten. Wie sie finden, hemmt Glucose-6-phosphat die Hexokinase aus Ascites-Tumor-Zellen um so wirksamer, je weiter das Enzym gereinigt wird. Die Ursache der Diskrepanz des Enzymverhaltens in vivo und in vitro ist unklar. Sollten generell die Effektoren in der intakten Zelle eine bedeutend geringere Affinität gegenüber den Enzymen besitzen, als die in-vitro-Ergebnisse vermuten lassen, könnten sie kaum als Trigger-Substanzen das glykolytische Geschehen der Pasteurschen Reaktion beherrschen.

Auch wenn man von den dargestellten Ergebnissen P. Özands, H.T. Naraharas und C.F. Coris (53) absieht, läßt sich die aerobe Hemmung des Glucoseverbrauchs in Hefe (20) bisher nicht mit effektorischen Mechanismen erklären, da Hexokinase aus Hefe nicht auf Glucose-6-phosphat kinetisch anspricht (37). Dadurch werden die Vorstellungen F. Lynens (20), zumindest in bezug auf das Pasteur-Geschehen in Hefe, aktualisiert.

Pasteur-Effekt und NADH-NAD^+ -Potential

F. Lynen (17) hatte auf der Basis seiner Resultate gefordert, jede Manipulation der intrazellulären Phosphatkonzentration müsse den Pasteur-Effekt beeinflussen. Diese Voraussage in der tierischen Zelle nachzuprüfen, stellt den Ausgangspunkt für eine Bearbeitung der Pasteur-Problematik durch die Arbeitsgruppe um E. Meyer dar. Insbesondere erschien es interessant, herauszufinden, ob sich Veränderungen der intrazellulären Phosphatkonzentration bereits auf der Stufe der Glykogenphosphorolyse auswirken würden, wie man nach F. Lynen (17) erwarten sollte.

Experimentelle Schwierigkeiten entstehen, weil sich morphologisch intakte Zellen gegenüber Phosphat, wie R. Höber (54) und G. Hevesy (55) zeigen, weitgehend impermeabel verhalten. Versucht man aber, diese Permeabilitätsschranke durch Zellaufschluß aufzuheben, so beseitigt man in den meisten tierischen Geweben nach W. Kutscher, G. Keith und W. Sarreither (56), sowie W. Kutscher und W. Sarreither (57) zugleich das Untersuchungsobjekt Pasteur-Effekt. Einen Ausweg bieten die Ergebnisse A. Hahns, E. Fischbachs und H. Niemers (58) an. Die genannten Autoren finden in Rindsmuskel auch nach der Zellaufschließung einen Pasteur-Effekt. Als besonders geeignetes Gewebe erweist sich Stiernackenmuskel, der deswegen von uns als Ausgangsmaterial benutzt wird (59,60).

Die Muskelfragmente, die man mit Hilfe eines Fleischwolfs erhält, retinieren nicht mehr wie unversehrte Fasern das anorganische Phosphat (60). Diesem Ergebnis entspricht das histologische Bild, das aufgeschnittene Muskelzellen zeigt (60). Der chemische und der histologische Befund rechtfertigen die Annahme, daß dieses biologische System auch für andere niedermolekulare Stoffe keine experimentell hinderlichen Permeabilitätsschranken gegenüber dem Suspensionsmedium besitzt. Damit eröffnet sich hier die Möglichkeit, verschiedene Stoffe über das Inkubationsmilieu in die mit ihm kommunizierende

wasserlösliche Phase des Systems kontrolliert einzuschleusen und ihre Wirkungen auf den Pasteur-Effekt zu studieren (24,59,60,61,62,63,64,diese Arbeit). Da sich außerdem die Fibrillen innerhalb der Fragmente histologisch hinsichtlich Querstreifung und Längsanordnung nicht von unversehrten Muskelfasern unterscheiden (60), entspricht das benutzte Versuchsmaterial einer methodischen Forderung, die zum Beispiel die erläuterten Ergebnisse P. Özands, H.T. Naraharas und C.F. Coris (53) begründen, nämlich der Forderung, ein Regulationsphänomen wie den Pasteur-Effekt mit Hilfe eines zumindest weitgehend intakten biologischen Systems aufzuklären.

Bisher haben sich die Untersuchungen mit Muskelfragmenten vorzugsweise auf die Regulation der Glykogenphosphorolyse im Rahmen der Pasteurschen Reaktion erstreckt und dabei zu den folgenden Ergebnissen geführt:

1. Auch wenn man anorganisches Phosphat in großen Mengen zusetzt und damit als möglicherweise begrenzenden Faktor ausschließt, bleibt die aerobe Glykogenphosphorolyse gehemmt (59,60). Daß das Phosphat in ausreichender Diffusionsgeschwindigkeit an den intrazellulären Reaktionsort gelangt, zeigen kinetische Messungen der Phosphatdiffusion und der anaeroben glykogenolytischen Geschwindigkeit bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen (60).

2. Bei 90%iger Entkopplung durch 2.4-Dinitrophenol in Gegenwart hoher Phosphatkonzentrationen lockert sich die aerobe glykogenolytische Hemmung nur geringfügig (24). Da das Adenylsäuresystem, das sich bei diesem Entkopplungsgrad in einem quasi-anaeroben Zustand befindet, die aerobe Hemmung der Glykogenphosphorolyse nicht beseitigt, kann es an der Kontrolle der glykogenolytischen Geschwindigkeit im Rahmen des Pasteur-Effekts weder über effektorische Mechanismen noch Cosubstrat-, beziehungsweise Substrat-Ferment-Beziehungen beteiligt sein.

Die verschiedenartig wirkende Substanz 2.4.-Dinitrophenol (19,24) wird in einer Konzentration eingesetzt, in der sie überwiegend entkoppelnd wirkt (24). Als Indikator des Entkopplungsgrades dient die Summe der Gehalte an Creatinphosphat und Adenosintriphosphat (24).

3. Adenosin-5'-phosphat beschleunigt die aerobe Glykogenolyse erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen auf den anaeroben Wert (61). Dieses Ergebnis bestätigt die Interpretation der Versuche mit 2.4.-Dinitrophenol (24) hinsichtlich der effektorischen Rolle des Adenylsäuresystems. Dagegen unterscheidet es sich quantitativ von den Resultaten H.E. Morgans und A. Parmeggianis (38), die eine hohe Affinität von Adenosin-5'-phosphat gegenüber gereinigter Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel finden.

4. Blockiert man die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit Bromessigsäure, so beeinträchtigen die angereicherten Hexosephosphate nicht die anaerobe Glykogenolyse (60), obwohl das auf der Basis effektorischer Mechanismen zu erwarten wäre (38).

Da weder ein Mangel an Cosubstrat noch effektorische Wirkungen den Pasteur-Effekt auf der Stufe der Glykogenphosphorolyse erklären (24,59,60,61), postulieren E. Meyer und B. v. Bock (63) in einer Arbeitshypothese einen funktionellen Zusammenhang zwischen der glykogenolytischen Reaktionsgeschwindigkeit und dem Redoxzustand des Elektronen transportierenden Systems der Atmung. Über Oxidoreduktionen innerhalb des phosphorolytischen Enzymsystems könnte die Atmung die Phosphorylaseaktivität verändern und dadurch den Glykogenabbau kontrollieren.

Oxidative Vorgänge im Rahmen der Pasteurschen Reaktion hat F. Lipmann (65) bereits postuliert. Er extrahiert ein glykolysierendes System aus Meerschweinchenmuskel, dessen Lactatbildung er durch geringe Konzentrationen von Jod und Chinon hemmt (65). Die Experimente F. Lipmanns (65) geben allerdings keine Hinweise auf die physiologische Realisierbarkeit eines solchen oxidativen Mechanismus.

5. Ein im Hinblick auf die genannte Arbeitshypothese interessantes Ergebnis erhält man durch die Unterbrechung der Wasserstoffzyklen, die die Kommunikation der cytoplasmatischen und mitochondrialen Nicotinadenindinucleotid-Systeme ermöglichen. Da reduziertes Nicotinadenindinucleotid nach A.L. Lehninger (66) die mitochondriale Membran nicht passieren kann, erfolgt der Wasserstofftransport über Substrate, die ohne weiteres die mitochondriale Wand permeieren und in den Mitochondrien oxidiert werden. H. Zebe, A. Delbrück und T. Bücher (67) haben zum erstenmal die funktionelle Zusammengehörigkeit von cytoplasmatischer α -Glycerophosphat-Dehydrogenase- und mitochondrialer α -Glycerophosphat-Oxidase-Reaktion im Flugmuskel der Wanderheuschrecke erkannt, und den α -Glycerophosphat-Zyklus formuliert, der den Wasserstoff des cytoplasmatischen reduzierten Nicotinadenindinucleotids auf ein mitochondriales Flavoprotein transportiert. Durch hohe α -Glycerophosphatkonzentrationen, die aus thermodynamischen Gründen die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat verhindern, läßt sich dieser Zyklus hemmen. Andere Zyklen, die wie der in der Literatur diskutierte β -Hydroxybutyrat-Zyklus T.M. Devlins und B.H. Bedells (68) den Wasserstoff in den Mitochondrien wieder an das Nicotinadenindinucleotid-System abgeben, lassen sich durch das Barbiturat Amytal hemmen, denn diese Substanz erschwert die Oxidation reduzierten Pyridindinucleotids durch die Flavoproteine der Atmung. Diese Wirkung findet man auch in den untersuchten Muskelfragmenten. Setzt man einer Suspension der Fragmente in Phosphatpuffer unter Sauerstoff $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal zu, so sinkt der Sauerstoffverbrauch auf 25% des Normwertes (63). Während ein Zusatz von β -Hydroxybutyrat wirkungslos bleibt, heben α -Glycerophosphat und Succinat in 10^{-1} M Konzentration in Gegenwart von Amytal die Atmung wieder auf ihre normale Größe an (63), indem sie die Amytal-Sperre "umgehen" und Flavogruppen reduzieren.

Ein gleichzeitiger Zusatz von 10^{-1} M α -Glycerophosphat und $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal beseitigt die aerobe Hemmung der Glykogenphosphorolyse der Muskelfragmente völlig (63). Die beiden Stoffe wirken allein deutlich schwächer. Die Unterbindung der Kommunikation der cytoplasmatischen und mitochondrialen Nicotinadenindinucleotid-Systeme "entkoppelt" also Glykogenolyse und Atmung.

6. Von verschiedenen, biologischen, den Fragmenten zugesetzten Reduktionsmitteln enthemmt nur reduziertes Nicotinadenindinucleotid die aerobe Glykogenolyse. Je mehr reduziertes Nicotinadenindinucleotid man gibt, je negativer also das Potential ist, um so mehr Glykogen wird abgebaut (63).

7. Vergleicht man die Ergebnisse nach Inkubation der Fragmente im Vakuumversuch und nach aerober Inkubation in Gegenwart und Abwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal und 10^{-1} M α -Glycerophosphat, so zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Glykogenabbau, Anteil von Phosphorylase a an der Phosphorylase-Gesamtaktivität und Negativität des Nicotinadenindinucleotid-Potentials (62,64).

Der "gemeinsame Nenner" der aufgeführten Resultate bestätigt die Richtigkeit der oben genannten Arbeitshypothese. Das Pasteur-Geschehen im Bereich der Glykogenphosphorolyse läßt sich auf das Aktivitätsverhältnis von Phosphorylase-b-Kinase zu Phosphorylase-a-Phosphatase beziehen, das seinerseits durch das Redoxpotential des Nicotinadenindinucleotidsystems bestimmt wird. Die Atmung entscheidet über die Geschwindigkeit der Glykogenphosphorolyse, indem sie mit Hilfe des Nicotinadenindinucleotid-Potentials die Bildung von Phosphorylase a in der Zeiteinheit kontrolliert.

Mechanismus des Pasteur-Effekts auf den Stufen der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion

Die bisherigen experimentellen Befunde unserer Arbeitsgruppe geben über das Verhalten der Glykogenphosphorolyse im Rahmen der Pasteurschen Reaktion Aufschluß.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit weiteren Angriffsorten des Pasteur-Effekts in dem glykolytischen System der Muskelfaserfragmente; sie behandelt den Mechanismus der aeroben Hemmung von Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion. Besondere Berücksichtigung finden die Theorie F. Lynens (20) und die Möglichkeit effektorischer Wirkungen im Rahmen des Pasteur-Effekts.

METHODIK

Gewinnung des Versuchsmaterials

Aus dem Nacken eines 15 bis 24 Monate alten Stiers wird kurz nach der Schlachtung Muskelgewebe geschnitten und in Streifen großer Oberfläche auf 8 bis 9° C gekühlt. Anschließend wird das Muskelgewebe nach Entfernung aller übrigen Bestandteile zweimal durch einen gekühlten Fleischwolf mit einer Siebplatte von 2 mm Lochweite gedreht. Die so erhaltenen Muskelfragmente werden sorgfältig gemischt und unter definierten Bedingungen inkubiert.

Inkubationsversuche

Die Muskelfragmente werden in einer ph-gepufferten Lösung, entsprechend dem folgenden Ansatz, suspendiert:

15,0 g Muskelfaserfragmente

40,0 ml Lösungsmittel.

Das Lösungsmittel enthält in allen Experimenten anorganisches Phosphat und in vielen Versuchen außerdem Zwischenstoffe der Glykolyse oder des Citronensäurezyklus, Cofaktoren und verschiedene Hemmstoffe. Das zugegebene Phosphat erhöht nach E. Meyer, P.M. Reisert und B. v. Kuhenheim (60) die intrazelluläre Phosphatkonzentration um $2,8 \cdot 10^{-2}$ M.

Die Pufferung der Suspension erfolgt in allen Versuchsanätzen vor allem durch den Phosphatpuffer; aber auch einige andere Zusätze, z.B. αGP^{+}), zeigen infolge einer relativ großen Pufferkapazität als Begleiteffekt neben der primär gewünschten Wirkung eine ph-Stabilisierung des Inkubationsmilieus. Die puffernden Komponenten der Suspensionslösung werden in den meisten Versuchen elektrometrisch auf $\text{ph} = 7,0$, in einigen auf $\text{ph} = 7,3$ oder $\text{ph} = 6,6$ eingestellt.

+) siehe Seite 23

+) In dieser Arbeit werden die folgenden Abkürzungen benutzt:

ADP	=	Adenosindiphosphat	MDH	=	Malatdehydrogenase
ALD	=	Aldolase	NAD ⁺	=	oxidiertes Nicotinadenindinucleotid
AMP	=	Adenosin-5'-monophosphat	NADH	=	reduziertes Nicotinadenindinucleotid
ATP	=	Adenosintriphosphat	NADP ⁺	=	oxidiertes Nicotinadenindinucleotidphosphat
CIT	=	Citrat	NADPH	=	reduziertes Nicotinadenindinucleotidphosphat
CK	=	Creatinkinase	OA	=	Oxalacetat
CL	=	Citratlyase	PEP	=	Phosphoenolpyruvat
CR	=	Creatin	2PG	=	2-Phosphoglycerat
DAP	=	Dihydroxyacetonphosphat	3PG	=	3-Phosphoglycerat
EDTA	=	Äthylendiamin-tetraessigsäure	6PG	=	6-Phosphogluconat
ENOL	=	Enolase	PGK	=	Phosphoglyceratkinase
FDP	=	Fructosediphosphat	PGM	=	Phosphoglyceratmutase
F6P	=	Fructose-6-phosphat	1.3.-PGP	=	1.3.-Diphosphoglycerat
GAP	=	Glycerinaldehydphosphat	2.3.-PGP	=	2.3.-Diphosphoglycerat
GAPDH	=	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	PHI	=	Hexose-6-phosphat-Isomerase
αGDH	=	α-Glycerophosphatdehydrogenase	PK	=	Pyruvatkinase
GLC	=	Glucose	PY	=	Pyruvat
GLY	=	Glycin	TIM	=	Triose-3-phosphat-Isomerase
αGP	=	α-Glycerophosphat	TRA	=	Triäthanolamin
G6Pase	=	Glucose-6-phosphatase			
G6P	=	Glucose-6-phosphat			
G6PDH	=	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase			
HK	=	Hexokinase			
LAC	=	Lactat			
LDH	=	Lactatdehydrogenase			

Die Muskelfragmente und die Bestandteile der Suspensionslösung werden in eisgekühlte Reaktionsröhrchen mit 250 ml Inhalt gegeben. Unter weiterer Kühlung evakuiert eine Wasserstrahlpumpe alle Ansätze, so daß in den Reaktionsröhren ein Druck von etwa 10 mm Hg-Säule herrscht.

Damit sind anaerobe Bedingungen hergestellt. Anschließende Füllung mit reinem Sauerstoff schafft in den dafür vorgesehenen Ansätzen aerobe Versuchsbedingungen.

Die Inkubation findet in einem thermostatisierten Wasserbad bei $+22^{\circ}\text{C}$ unter langsamer Bewegung statt. Ihre Dauer beträgt 60 oder 120 Minuten.

Extraktionsverfahren

Nach der Inkubation werden die Suspensionen in Eiswasser gekühlt und ph-gemessen. Die anschließende Eiweißfällung erfolgt mit kalter 5%iger Perchlorsäure. Homogenisation mit einem Ultraturrax TP 18/2 der Firma Janke u. Kunkel und kurze Inkubation des Homogenats, das mit 5%iger Perchlorsäure auf ein definiertes Volumen aufgefüllt wird, sichern die Unterbrechung sämtlicher enzymatischer Reaktionen.

Aus einem aliquoten Teil des Filtrats, das man mit Faltenfilter der Firma Macherey u. Nagel (Nr. 616 1/4) herstellt, fällt man die Perchlorsäure als Kaliumsalz mit $\text{TRA-K}_2\text{CO}_3$ -Puffer (0,8 M TRA; 1,3 M K_2CO_3) unter gleichzeitiger Alkalisierung der Extraktionslösung. Mit Hilfe eines Schwarzbandfilters der Firma Schleicher u. Schüll (Nr. 589¹) läßt sich der Niederschlag abtrennen. Das erhaltene, schwach alkalische Filtrat wird zur Metabolitanalyse eingesetzt. Sämtliche Aufarbeitungsschritte erfolgen bei 0°C (Eiswasser).

Das beschriebene Extraktionsverfahren wird durch Zusatz einiger Metaboliten nach der Eiweißfällung und ihre Bestimmung aus dem fertigen Extrakt quantitativ kontrolliert.

In diesen Recovery-Versuchen, durchgeführt mit GLC, G6P, F6P, FDP, PY und LAC, findet man, unter Berücksichtigung der präformierten Mengen, jeweils 97 bis 103 % der Zusatzmenge wieder.

Extraktanalyse

Sämtliche Metabolitbestimmungen der vorliegenden Arbeit erfolgen enzymchemisch⁺⁾ nach dem Prinzip des von O. Warburg (69) entwickelten optischen Tests.

Praktische Hinweise enthalten die zusammenfassende Darstellung von T. Bücher, W. Luh und D. Pette (70) und die Methodensammlung H.U. Bergmeyers (71).

Im Einzelnen werden die eingesetzten analytischen Methoden den Erfordernissen dieser Arbeit angepaßt.

Alle Extinktionswerte werden in einem Eppendorf-Photometer bei einer konstanten Temperatur von 25°C gemessen. Das Lambert-Beersche-Gesetz, dem die hier beschriebenen Test-Verfahren ohne Ausnahme entsprechen, ermöglicht die Berechnung der metabolischen Konzentration im Testansatz. Die dazu benötigten Extinktionskoeffizienten der reduzierten Pyridindinucleotide NADH und NADPH bei 25°C betragen $\epsilon = 3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ bei $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ (72) und $\epsilon = 6,0 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ bei $\lambda = 334 \text{ m}\mu$ (73). In Recovery-Versuchen, durch die Analyse von Metabolitlösungen bekannter Konzentration, lassen sich alle hier beschriebenen Tests quantitativ kontrollieren.

Die mittlere Abweichung der wiedergefundenen Menge von der Zusatzmenge beträgt bei allen Verfahren höchstens $\pm 1,6 \%$! Ausnahmen werden im Rahmen der Testbeschreibung angegeben.

+) Alle hier verwendeten Enzyme werden von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen.

2. Leerwerte

Reagenzien-Leerwert

Die im Analysenansatz durch die Reagenzien hervorgerufene Extinktionszunahme wird in einem besonderen Ansatz, der H_2O anstelle von Extrakt enthält, unter Wiederholung des Meßgangs als Reagenzien-Leerwert bestimmt.

Extrakt-Leerwert

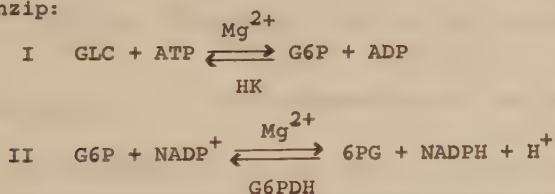
Die auf die Absorption des Extrakts zurückzuführende Extinktionszunahme wird entsprechend in einem Ansatz mit H_2O anstelle der Reagenzien-Zusätze als Extrakt-Leerwert gemessen.

Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^\circ\text{C}$,
Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 334 \text{ m}\mu$

Durch Subtraktion der zugehörigen Leerwerte von dem jeweiligen Analysenwert erhält man die Extinktionsdifferenzen für G6P und H6P, die eine weitere Berechnung ermöglichen.

Bestimmung von GLC

Prinzip:



GLC wird mit Hilfe einer Gesamtbestimmung und einer G6P-Analyse berechnet. Der hier beschriebene Test stellt ein Verfahren mit konstantem Endwert dar.

Reagenzien:

$5 \cdot 10^{-2}$ M TRA-Puffer; $\text{ph} = 7,6$; mit MgCl_2 ($1 \cdot 10^{-3}$ M)
 $1,6 \cdot 10^{-2}$ M ATP
 $2,3 \cdot 10^{-2}$ M β -NADP⁺
2 mg/ml = 280 I.E./ml HK
1 mg/ml = 140 I.E./ml G6PDH

Testansätze zur Gesamtbestimmung:

1. Analysenwert

Nacheinander werden in ein Reagenzglas gegeben:

2,00 ml TRA-Puffer mit MgCl_2 ($3,4 \cdot 10^{-2}$ M TRA⁺)
 $6,7 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2 ^{+))}

0,80 ml Extrakt

0,10 ml ATP ($5,4 \cdot 10^{-4}$ M^{+))}

0,05 ml NADP⁺ ($3,9 \cdot 10^{-4}$ M^{+))}

0,01 ml HK (0,9 I.E./ml^{+))}

0,01 ml G6PDH (0,5 I.E./ml^{+))}

Extinktionsmessung nach 10 min. Inkubation bei 25°C
ergibt den Analysenwert.

2. Leerwerte

Ein Reagenzien- und ein Extrakt-Leerwert werden in
Analogie zum G6P-F6P-Test bestimmt.

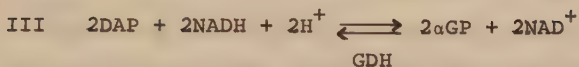
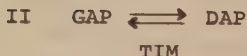
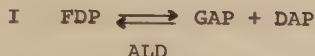
Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^\circ\text{C}$, $d = 1$ cm
und $\lambda = 334$ m μ l

Die dem Gesamtgehalt an GLC und G6P entsprechende Ex-
tinktionsdifferenz erhält man durch Subtraktion der
Leerwerte vom Analysenwert.

+) Molarität, bzw. Aktivität/ml Testansatz

Bestimmung von FDP

Prinzip:



Der Extinktionsschwund durch NADH-Oxidation ist ein Maß für den Gehalt an FDP und T3P. Durch eine T3P-Analyse und eine Gesamtbestimmung im kombinierten Test läßt sich der Gehalt an FDP berechnen. Das Verfahren führt zu konstanten Endwerten.

Reagenzien:

$5 \cdot 10^{-2}$ M TRA-Puffer; ph = 7,6

$1,2 \cdot 10^{-2}$ M β -NADH

10 mg/ml = 90 I.E./ml ALD

2 mg/ml = 4800 I.E./ml TIM

2 mg/ml = 72 I.E./ml GDH

Testansätze:

1. Analysenwerte

Nacheinander werden in ein Reagenzglas gegeben:

2,00 ml TRA-Puffer ($3,5 \cdot 10^{-2}$ M⁺)

0,80 ml Extrakt

0,03 ml β -NADH ($1,3 \cdot 10^{-4}$ M⁺)

0,01 ml TIM (16,7 I.E./ml⁺)

0,02 ml GDH (0,5 I.E./ml⁺)

1. Analysenwert nach 10 min. Inkubation bei 25°C!

+) Molarität, bzw. Aktivität im Testansatz

0,01 ml ALD (0,3 I.E./ml⁺)

2. Analysenwert nach 10 min. Inkubation bei 25°C!

2. Leerwerte

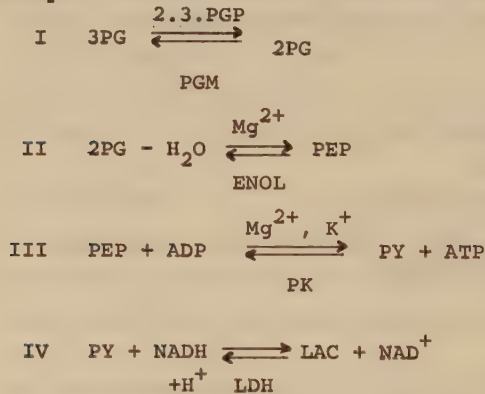
Die Reagenzien- und Extrakt-Leerwerte werden in Analogie zum G6P-F6P-Test bestimmt.

Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^{\circ}\text{C}$,
 $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 366 \text{ m}\mu$.

Durch Subtraktion der Analysenwerte von der Summe der zugehörigen Leerwerte erhält man die Extinktionsdifferenzen für T3P und für 2FDP und T3P.

Bestimmung der Gesamtmenge von 3PG, 2PG und PEP

Prinzip:



Die Summe der Metaboliten 3PG, 2PG und PEP lässt sich mit Hilfe einer Gesamtbestimmung und einer PY-Analyse berechnen.

Beide Tests stellen Verfahren mit inkonstantem Endwert dar.

+) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

Reagenzien:

$1,5 \cdot 10^{-1}$ M TRA-Puffer; $\text{ph} = 7,6$; mit MgCl_2 ($1,5 \cdot 10^{-2}$ M)
KCl ($1,5 \cdot 10^{-2}$ M)
ADP ($3,1 \cdot 10^{-3}$ M)
 $5,9 \cdot 10^{-3}$ M β -NADH
10 mg/ml = 180 I.E./ml PGM
10 mg/ml = 270 I.E./ml ENOL
10 mg/ml = 1250 I.E./ml PK
5 mg/ml = 1800 I.E./ml LDH

Testansatz zur Gesamtbestimmung:

Nacheinander werden in eine Küvette pipettiert:

1,00 ml TRA-Puffer mit MgCl_2 , KCl, ADP ($4,9 \cdot 10^{-2}$ M TRA⁺);
 $4,9 \cdot 10^{-3}$ M MgCl_2 ⁺);
 $4,9 \cdot 10^{-3}$ M KCl⁺);
 $1,0 \cdot 10^{-3}$ M ADP⁺)

2,00 ml Extrakt

0,02 ml PGM ($1,2$ I.E./ml⁺)
0,01 ml ENOL ($0,9$ I.E./ml⁺)
0,01 ml PK ($4,1$ I.E./ml⁺)
0,02 ml NADH ($3,8 \cdot 10^{-5}$ M⁺)

Der gemessene Extinktionswert entspricht dem Anfangswert der Testreaktion.

0,01 ml LDH ($5,9$ I.E./ml⁺)

Nach 15 min. Inkubation bei 25°C wird der Extinktionsverlauf während einer Zeit von 10 min. gemessen.

Extrapolation auf den Startzeitpunkt ergibt den Endwert.

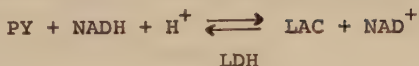
Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^\circ\text{C}$,

$d = 2$ cm und $\lambda = 334 \text{ m}\mu$!

+) Molarität, bzw. Aktivität im Testansatz

Bestimmung von PY

Prinzip:



Die PY-Bestimmung ist ein Verfahren mit inkonstantem Endwert.

Reagenzien:

- $1,5 \cdot 10^{-1}$ M TRA-Puffer; ph = 7,6
- $5,9 \cdot 10^{-3}$ M β -NADH
- 5 mg/ml = 1800 I.E./ml LDH

Testansatz:

Nacheinander sind in eine Küvette zu pipettieren:

- 1,00 ml TRA ($5 \cdot 10^{-2}$ M⁺)
- 2,00 ml Extrakt
- 0,02 ml β -NADH ($3,9 \cdot 10^{-5}$ M⁺)

Extinktionsmessung führt zum Anfangswert der Testreaktion.

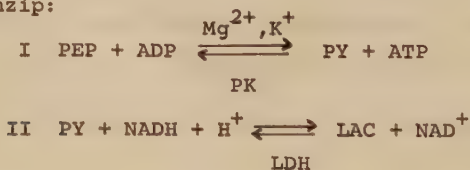
0,01 ml LDH (5,9 I.E./ml⁺)

Nach 15 min. Inkubation bei 25°C wird 10 min. lang der Extinktionsverlauf gemessen. Extrapolation auf den Startzeitpunkt ergibt den Endwert.

Bedingungen der Extinktionsmessungen: t = 25°C,
d = 2 cm und $\lambda = 334 \text{ m}\mu$!

Bestimmung von PEP

Prinzip:



+) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

Durch Zusatz eines geringen Volumens einer PEP-Lösung bekannter Konzentration wird anschließend im gleichen Ansatz das Verfahren quantitativ kontrolliert.

Ergebnis dieser Recovery-Versuche: 99,1% $\pm$ 4,6

Bestimmung von LAC⁺)

Prinzip:



Durch Abfangen des entstandenen PY als Hydrazon und Alkalisierung des Reaktionsmilieus wird LAC quantitativ umgesetzt.

Reagenzien:

$5 \cdot 10^{-1}$ M Gly-Puffer; ph = 9,0; mit Hydrazin ($4 \cdot 10^{-1}$ M)
 $2,7 \cdot 10^{-2}$ M β -NAD⁺
2 mg/ml = 720 I.E./ml LDH

Testansätze:

1. Analysenwert

Nacheinander werden in ein Reagenzglas pipettiert:

2,00 ml Gly-Puffer mit Hydrazin ($4,1 \cdot 10^{-1}$ M Gly⁺⁺)
 $3,3 \cdot 10^{-1}$ M Hydrazin⁺⁺)

0,20 ml Extrakt

0,03 ml LDH ($8,9$ I.E./ml⁺⁺)

0,20 ml β -NAD⁺ ($2,2 \cdot 10^{-3}$ M⁺⁺)

Nach 1 Std. Inkubation bei 25°C wird der Analysenwert photometrisch gemessen.

+) Die Testzusammensetzung entspricht weitgehend dem Vorschlag der Firma Boehringer, Mannheim, deren Testpackung, Art. TC B 15972, verwendet wird.

++) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

2. Leerwert

Ein Reagenzien-Leerwert, der in einem Ansatz mit H_2O anstelle von Extrakt nach einstündiger Inkubation bei $25^{\circ}C$ photometrisch gemessen wird, berücksichtigt die Absorption der Reagenzien und die eines Reaktionsproduktes des Hydrazins mit NAD^{+} .

Die Bestimmung eines Extrakt-Leerwertes erübrigt sich im Hinblick auf den hohen Verdünnungsgrad des Extraktes bei der LAC-Analyse in dieser Arbeit.

Die dem LAC-Gehalt entsprechende Extinktionsdifferenz erhält man durch Subtraktion des Reagenzien-Leerwerts vom Analysenwert.

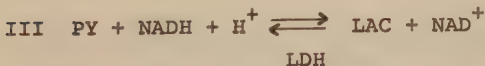
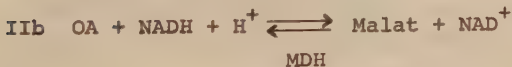
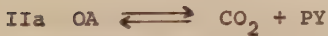
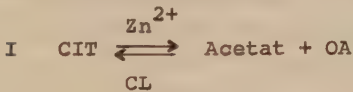
Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^{\circ}C$.

$d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 366 \text{ m}\mu$

Bestimmung von Citrat

Die Citrat-Analyse mit Hilfe von CL wurde durch Arbeiten von W. Gruber und H. Moellering (74) ermöglicht, denen es gelang das Enzym CL zu stabilisieren.

Prinzip der Bestimmung:



+) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

Die Testzusammensetzung entspricht den Angaben W. Grubers und H. Moellerings (74); der Meßgang wird den Erfordernissen der in dieser Arbeit dargestellten Versuche angepaßt, indem im Hinblick auf die relativ niedrigen Citratkonzentrationen PY und OA vor dem Start der CL-Reaktion umgesetzt werden.

Die Testreaktion führt zu einem inkonstanten Endwert.

Reagenzien:

$1,1 \cdot 10^{-1}$ M TRA-Puffer, ph = 7,6

$3,0 \cdot 10^{-2}$ M ZnCl_2 , ph = 3,5

$1,2 \cdot 10^{-2}$ M β -NADH

15 mg/1,4 ml = 86 I.E./ml CL

5 mg/10 ml = 360 I.E./ml MDH

5 mg/ml = 1800 I.E./ml LDH

Testansatz:

Nacheinander werden in eine Küvette pipettiert:

2,800 ml TRA-Puffer ($6,9 \cdot 10^{-2}$ M⁺)

1,500 ml Extrakt

0,015 ml ZnCl_2 ($1,0 \cdot 10^{-4}$ M⁺)

0,090 ml β -NADH (a ml β -NADH + b ml H_2O = 0,09 ml;

der NADH-Zusatz wird dem Gehalt an
PY und OA angepaßt)

0,015 ml LDH (6,0 I.E./ml⁺)

0,020 ml MDH (1,6 I.E./ml⁺)

Nach kurzer Inkubation von etwa 10 min. bei 25°C wird der Anfangswert der Testreaktion photometrisch gemessen.

0,030 ml CL (0,6 I.E./ml⁺)

Nach 10 min. Inkubation bei 25°C wird der Extinktionsverlauf 6 min. lang verfolgt. Extrapolation auf den Startzeitpunkt der Testreaktion, der durch den CL-Zusatz festgelegt ist, ergibt den Endwert.

+) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

Durch anschließenden Zusatz eines geringen Volumens einer Citratlösung bekannter Konzentration wird im gleichen Ansatz das Testsystem quantitativ kontrolliert.

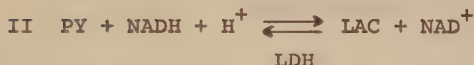
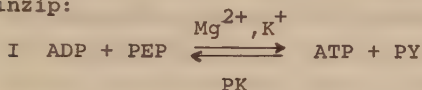
Ergebnis dieser Recovery-Versuche: $103,7\% \pm 5,4!$

Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^{\circ}\text{C}$,

$d = 2 \text{ cm}$ und $\lambda = 366 \text{ m}\mu$!

Bestimmung von ADP

Prinzip:



Im Extrakt vorhandenes PY wird vor dem Start der PK-Reaktion zu LAC umgesetzt. Das Verfahren führt zu einem inkonstanten Endwert.

Reagenzien:

$1,5 \cdot 10^{-1}$ TRA-Puffer; $\text{ph} = 7,6$; mit MgCl_2 ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$);
 KCl ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$)

$4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ PEP

$5,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ β -NADH

$5 \text{ mg/ml} = 1800 \text{ I.E./ml}$ LDH

$10 \text{ mg/ml} = 1250 \text{ I.E./ml}$ PK

Testansatz:

Nacheinander werden in eine Küvette pipettiert:

$1,30 \text{ ml}$ TRA-Puffer mit MgCl_2 und KCl ($4,9 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ TRA<sup>+) ;
 $4,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ MgCl_2 <sup>+) ;
 $4,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ KCl ^{+))}</sup></sup>

+) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

2,50 ml Extrakt

0,10 ml PEP ($1 \cdot 10^{-3} \text{ M}^+$)

0,09 ml β -NADH (= a ml β -NADH + b ml H_2O ; der NADH-Zusatz richtet sich nach dem PY-Gehalt)

0,01 ml LDH ($4,5 \text{ I.E./ml}^+$)

Nach kurzer Inkubation von etwa 10 min. bei 25°C wird der Anfangswert der Testreaktion photometrisch gemessen.

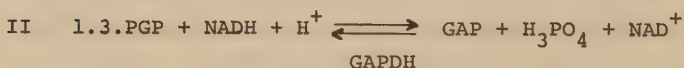
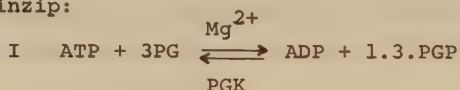
0,01 ml PK ($3,1 \text{ I.E./ml}^+$)

Nach 15 min. Inkubation bei 25°C wird der Endwert der Testreaktion durch Messung des Extinktionsverlaufs (10 min.) und Extrapolation auf den Startzeitpunkt (PK-Zusatz) bestimmt.

Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^\circ\text{C}$,
 $d = 2 \text{ cm}$ und $\lambda = 334 \text{ m}\mu$

Bestimmung von ATP^{++}

Prinzip:



Das Verfahren stellt eine Endwertbestimmung mit in-konstantem Endwert dar.

Der NADH-Schwund wird stöchiometrisch auf den ATP-Gehalt bezogen.

+) Molarität, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

++) Die Methode entspricht im Prinzip, bis auf Testzusammen-setzung und Meßgang, einem Vorschlag der Firma Boehringer, Mannheim, deren Testpackung, Art. TC I 15979, verwendet wird.

Reagenzien:

$1 \cdot 10^{-1}$ M TRA-Puffer, $\text{ph} = 7,6$ mit MgSO_4 ($4 \cdot 10^{-3}$ M);
3PG ($6 \cdot 10^{-3}$ M);
EDTA ($1,1 \cdot 10^{-3}$ M)
 $1,2 \cdot 10^{-2}$ M β -NADH
1 mg PGK + 4 mg GAPDH/ml = 180 I.E. PGK + 144 I.E.
GAPDH/ml

Testansatz:

Nacheinander werden in ein Reagenzglas oder eine
Küvette pipettiert:

2,40 ml TRA-Puffer mit MgSO_4 , 3PG, EDTA ($8,4 \cdot 10^{-2}$ M TRA⁺);
 $3,3 \cdot 10^{-3}$ M MgSO_4 ⁺);
 $5,0 \cdot 10^{-3}$ M 3PG⁺);
 $9,2 \cdot 10^{-4}$ M EDTA⁺)

0,40 ml Extrakt

0,03 ml β -NADH ($1,3 \cdot 10^{-4}$ M⁺)

Extinktionsmessung ergibt den Anfangswert der Reaktion

0,04 ml PGK, GAPDH ($2,5$ I.E. PGK/ml⁺)
 $2,0$ I.E. GAPDH/ml⁺)

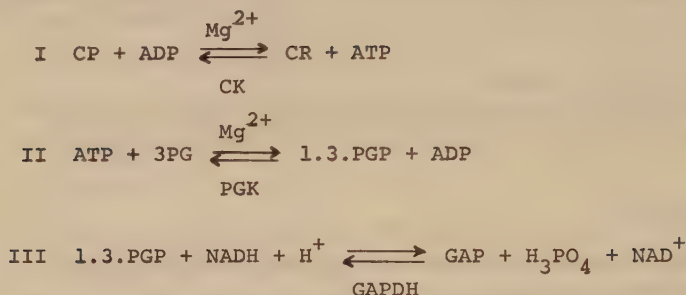
Nach 15 min. Inkubation bei 25°C wird der Extinktions-
verlauf 10 min. lang gemessen. Durch Extrapolation
auf den Startzeitpunkt erhält man den Endwert der
Testreaktion.

Bedingungen der Extinktionsmessungen: $t = 25^\circ\text{C}$,
 $d = 1$ cm und $\lambda = 366$ m μ !

+) Konzentration, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

Bestimmung von CP

Prinzip:



Die Bestimmung erfolgt nach einem Vorschlag E. Meyers und G. Seidels (50) im kombinierten Test, der als Erweiterung des ATP-Tests aufzufassen ist. Der CP-Gehalt wird mit Hilfe einer ATP-Analyse und einer Gesamtbestimmung berechnet.

Reagenzien:

Lösungen und Suspensionen des ATP-Tests; dazu
 20 mg/ml = 360 I.E./ml CK

Testansatz zur Gesamtbestimmung:

Nacheinander werden in ein Reagenzglas oder eine
 Küvette pipettiert:

2,40 ml TRA-Puffer mit MgSO_4 , 3PG, EDTA	$(8,2 \cdot 10^{-2} \text{ M TRA}^+)$;
	$3,3 \cdot 10^{-3} \text{ M MgSO}_4^+)$;
	$4,9 \cdot 10^{-3} \text{ M 3PG}^+)$;
	$9,1 \cdot 10^{-4} \text{ M EDTA}^+)$
0,40 ml Extrakt	
0,04 ml CK $(4,9 \text{ I.E./ml}^+)$	
0,03 ml β -NADH $(1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^+)$	

+) Konzentration, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

Der gemessene Extinktionswert entspricht dem Anfangswert der Reaktion

0,04 ml PGK, GAPDH (2,5 I.E. PGK/ml⁺);
2,0 I.E. GAPDH/ml⁺]

Nach 15 min. Inkubation bei 25°C wird durch Messung des Extinktionsverlaufs (10 min.) und Extrapolation auf den Startzeitpunkt der Endwert bestimmt.

Bedingungen der photometrischen Messungen: $t = 25^{\circ}\text{C}$,
 $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 366 \text{ m}\mu$!

+) Konzentration, bzw. Aktivität/ml im Testansatz

ERGEBNISSE

Aerobe Hemmung der Phosphofructokinase-Reaktion und Redox-abhängigkeit

Im Rahmen der experimentellen Auseinandersetzung mit der Pasteurschen Reaktion in den Muskelfaserfragmenten, mit Angriffsorten im glykolytischen System, die neben der Glykogenphosphorolyse gegeben sind, erscheint die Beschäftigung mit der Phosphofructokinase-Reaktion aus drei Gründen besonders interessant:

1. Legt man experimentelle Daten von B. Hess (75) zugrunde, so stellt die Phosphorylierung von F6P einen quasi-irreversiblen Reaktionsschritt dar, der als "Schrittmacher" (76) in dem hier verwendeten Versuchsmaterial zwar nicht die Glykogenphosphorolyse (24,29,60,61,62,63,64), aber zumindest die sich anschließende Metabolisierung von GlP zu FDP beherrschen könnte, da sich die Isomerisierung der glykolytischen Hexosemonophosphate nach B. Hess (75) quasi-reversibel verhält.

2. Gerade das Studium dieser Reaktion in Bäckerhefe führt F. Lynen (20) zu dem wichtigen Postulat der cytoplasmatischen Kammerung.

3. Das Enzym Phosphofructokinase bildet das Kernstück eines Pasteur-Effekts auf der Basis effektorischer Wirkungen (34, 35,38,43).

Ein unmittelbarer Anknüpfungspunkt an frühere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ergibt sich, wenn man die Muskelfaserfragmente mit $2,8 \cdot 10^{-2}$ M Phosphat bei $\text{pH} = 7,0$ eine Stunde im Vakuum und unter Sauerstoff bei 22°C inkubiert.

Die genannte Molarität des anorganischen Phosphats ist wie alle Konzentrationsangaben über Zusatzstoffe und gemessene Metaboliten auf die intrazelluläre wäßrige Phase der Muskel-

faserfragmente zu beziehen. Im Hinblick auf histologische und kinetische Untersuchungen E. Meyers, P.M. Reiserts und B. v. Kuhenheims (60) wird vorausgesetzt, daß zwischen biologischem System und Inkubationsmilieu eine ausreichende Kommunikation stattfindet.

Aus dem Gehalt eines Metaboliten im Gesamtvolumen der Suspension (77) läßt sich somit seine intrazelluläre Konzentration berechnen.

Tab. 1: H6P-Gehalt nach anaerober und aerober Inkubation

Gehalt an G6P, F6P und LAC, Quotient aus G6P und F6P nach sofortiger Unterbrechung der Ansätze und nach einstündiger anaerober und aerober Inkubation der Muskelfragmente in Phosphatpuffer (ph = 7,0) bei +22°C. (Mittelwerte aus 3 bis 8 Experimenten, teilweise aus 2 Exp., entsprechend den in Klammern gesetzten Zahlen.)

Versuchsbedingungen		µmol/g Muskel				
Inkubation	Zusätze ^{+) (Endkonz.)}	F6P	G6P	H6P	LAC	G6P/F6P
-		0,52	2,48	3,00	19,40	4,6
anaerob	-	0,34	1,50	1,84	46,19	4,4
aerob		0,51(2)	2,44(2)	2,95(2)	20,61	4,4(2)

+) Der Phosphatzusatz wird nicht besonders aufgeführt (vergl. Methodik).

Wie Tab. 1 zeigt, weicht der LAC-Gehalt nach einstündiger aerober Inkubation der Fragmente in Phosphatpuffer nicht von dem Ausgangswert ab, der durch den nicht inkubierten Versuchsansatz gegeben ist. Dagegen steigt LAC im Vakuumversuch an. Dieses unterschiedliche Verhalten entspricht dem Pasteur-Effekt. Offensichtlich ist das zugegebene Phos-

phat außerstande, ihn zu beseitigen. Der Befund der aeroben Konstanz des LAC-Gehalts bestätigt die Ergebnisse E. Meyers, P.M. Reiserts und B. v. Kuhenheims (60).

Einen ersten Einblick in das Pasteur-Geschehen auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung gestattet die Bestimmung von F6P und G6P aus den Versuchsansätzen, die zuvor der LAC-Analyse dienten (Tab. 1). Das Verhältnis der beiden Hexose-6-phosphate zueinander bleibt unter den verschiedenen Bedingungen in Übereinstimmung mit in der Literatur referierten Ergebnissen (2,11) konstant (Tab. 1). Allerdings ist der Quotient in den Muskelfragmenten ebenso wie zum Beispiel nach J.R. Williamson (2) derjenige im isolierten Rattenherz größer als die Gleichgewichtskonstante, die S.E. Kahana, O.H. Lowry, D.W. Schulz, J.V. Passonneau und E.J. Crawford (39) mit $K = 3,85$ bei 20°C angeben. Der Befund eines anaerob und aerob konstanten Quotienten aus G6P und F6P schließt die Beteiligung der PHI-Reaktion am Pasteur-Geschehen in diesem Versuchsmaterial aus. Demnach ist die Isomerisierung der beiden Hexose-6-phosphate einer glykolytischen "Staustrecke" (78) zuzuordnen. Setzt man die Glykolyse als den Hauptabbauweg der Kohlenhydrate voraus, so muß man nunmehr den jeweiligen Gehalt an H6P, also der Summe von G6P und F6P auf das Geschwindigkeitsverhältnis der glykolytischen Substratanlieferung zu der F6P-Phosphorylierung zurückführen. Da aerob die Glykogenphosphorolyse in den Muskelfragmenten nahezu völlig sistiert (59,60) und eine Hemmung der Glucosephosphorylierung im Hinblick auf zahlreiche Ergebnisse der Literatur, z.B. (1,11,14), wahrscheinlich ist, deutet der anaerob-aerobe Unterschied im H6P-Gehalt (Tab. 1) bereits auf eine unter Sauerstoff verminderte Geschwindigkeit der PFK-Reaktion hin. Mit der Möglichkeit resynthetischer Vorgänge im Rahmen des Pasteur-Geschehens, etwa auf der Basis der Pasteur-Meyerhof-Theorie (6), ist nicht zu rechnen. Vor allem die Untersuchungen A.C. Aisenbergs,

B. Reinafarjes und v.R. Potters (14), sowie A.C. Aisenbergs und v.R. Potters (15) schließen diese Möglichkeit aus.

Um die PFK-Reaktion zu einer deutlicheren Antwort zu zwingen, bieten wir den Muskelfragmenten F6P in einer dem Glykogengehalt etwa äquivalenten, also sehr großen Menge an. Die verwendete Substanz enthält zu einem geringen Prozentsatz G6P. Nach einstündiger Inkubation mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P unter Vakuum- und Sauerstoffbedingungen in Phosphatpuffer findet man ein anaerob und aerob weitgehend übereinstimmendes Verhältnis von G6P zu F6P (Tab. 2). Der G6P-F6P-Quotient, der in der angebotenen Substanz 0,08 beträgt, erreicht nach anaerober und aerober Inkubation mit 5,0 beziehungsweise 4,8 einen Wert, den die Phosphohexose-Isomerase auch ohne Substratzusätze in diesem biologischen System einstellt (Tab. 1, Tab. 2). Wie dieses Ergebnis zeigt, gelangt das zugesetzte Zuckerphosphat in ausreichender Geschwindigkeit an den Ort der Phosphohexose-Isomerase.

Der aerob-anaerobe Unterschied im H6P-Gehalt ist gegenüber den Versuchen ohne Substratzusätze (Tab. 1) deutlich gespreizt (Tab. 2).

Von der Summe des zugesetzten und präformierten H6P verbrauchen die Zellen in einer Stunde aerob etwa $8 \mu\text{mol/g}$ Muskel (Frischgewicht!) weniger als anaerob.

Der aerobe Verbrauch läßt sich über den anaeroben Wert hinaus steigern, wenn man außer $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P noch $1 \cdot 10^{-1}$ M αGP und $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH gibt und die Fragmente im übrigen wie im aeroben Versuch behandelt (Tab. 2). Auch unter diesen Bedingungen ist die Isomerisierung der glykolytischen Hexose-6-phosphate, wie ihr Quotient zeigt (Tab. 2), nicht betroffen.

Die hier gefundene Wirkung von αGP und NADH erinnert an Untersuchungen des Pasteur-Effekts auf der Stufe der Glykogenphosphorolyse (63,64). Nach aerober Inkubation der Muskelfaserfragmente mit 10^{-1} M αGP und $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH er-

Tab. 2: H6P-Verbrauch im Vakuum, sowie unter Sauerstoff mit und ohne Zusatz von NADH und α GP

Gehalt an F6P, G6P und GLC, Quotient aus G6P und F6P, sowie H6P-Verbrauch nach sofortiger Unterbrechung der Ansätze und nach anaerober und aerober Inkubation der Muskelfragmente (60 min., 22°C) in Phosphatpuffer (pH = 7,0) mit 10^{-2} M H6P und Stoffen, die das Redoxpotential des NADH-NAD⁺-Systems negativieren (NADH, α GP). (Mittelwerte aus 3 bis 8 Exp.)
H6P-Gehalt zu Inkubationsbeginn (= präformierte + zugesetzte H6P-Menge) = 38,95 μ mol H6P/g Muskel.

Versuchsbedingungen		μ mol/g Muskel				H6P-Verbrauch	
Inkubation	Zusätze	F6P	G6P	H6P	GLC	μ mol/g	in % des Vakuumverbrauchs
-	-	0,52	2,48	3,00	0,96		4,6
anaerob	$9,4 \cdot 10^{-3}$ M F6P	1,26	6,25	7,51	1,64	31,44	100,0
	$0,7 \cdot 10^{-3}$ M G6P						5,0
aerob	$9,4 \cdot 10^{-3}$ M F6P	2,65	12,59	15,24	1,52	23,72	75,4
	$0,7 \cdot 10^{-3}$ M G6P						4,8
	$9,4 \cdot 10^{-3}$ M F6P						
	$0,7 \cdot 10^{-3}$ M G6P	0,46	2,16	2,62	2,30	36,34	115,6
	$2 \cdot 10^{-3}$ M NADH						
	$1 \cdot 10^{-1}$ M α GP						4,7

reichen nach E. Meyer (63,64) der Glykogenabbau und die Enzymmenge an Phosphorylase a anaerobe Werte. Unter Berücksichtigung zahlreicher anderer experimenteller Daten führen E. Meyer und Mitarbeiter (24,59,60,61,62,63,64) dieses glykogenolytische Verhalten auf eine Zunahme der Reduktionskraft des NADH-NAD^+ -Systems zurück. Die hohe αGP -Konzentration blockiert nach E. Meyer (63) den sonst aerob ablaufenden, von H. Zebe, A. Delbrück und T. Bücher (67) erstmals formulierten αGP -Zyklus, indem sie aus thermodynamischen Gründen die Oxidation des NADH durch die GDH -Reaktion verhindert. So wird es verständlich, daß ein αGP -Zusatz den Effekt von zugegebenem NADH verstärkt (63,64).

Da die Gegenwart von αGP und NADH unter Sauerstoff die Metabolisierung des zugesetzten H6P ebenso wie diejenige des Glykogens beschleunigt, liegt es nahe, aus Analogiegründen die Abhängigkeit des H6P -Verbrauchs vom Potential des NADH-NAD^+ -Systems zu postulieren. Wenn der unterschiedliche Durchsatz des zugesetzten H6P , den man unter verschiedenen Versuchsbedingungen findet (Tab. 2), auf die Geschwindigkeit der PFK -Reaktion als gemeinsame Ursache zurückzuführen wäre, könnte man einen Kausalzusammenhang zwischen dieser Reaktionsgeschwindigkeit und dem Potential des NADH-NAD^+ -Paares annehmen.

Die damit genannte Voraussetzung, nämlich die Beziehung zwischen H6P -Verbrauch und PFK -Reaktion, läßt sich allerdings nicht ohne weiteres den Ergebnissen der Tab. 2 entnehmen. Die Inkubation der Muskelfragmente mit $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ H6P führt zu einem von den übrigen Versuchsbedingungen abhängigen Anstieg des Glucosegehalts im Vergleich zu dem Ausgangswert des nicht inkubierten Versuchsansatzes (Tab.2). Auch wenn die gemessenen Glucosewerte quantitativ nicht den unterschiedlichen H6P -Verbrauch erklären können, so zeigen sie qualitativ doch die Schwierigkeit, die in Tab. 2 festgehaltenen Resultate der Metabolitanalyse eindeutig zu

interpretieren. Denn schließt man auch die unmittelbare Beteiligung resynthetischer Vorgänge am Pasteur-Effekt aus (14,15) und erkennt man die Glykolyse als den Hauptabbauweg der Kohlenhydrate an, so könnte doch ein Zusatz solcher großer H6P-Mengen (Tab. 2) einerseits durch rückläufige Reaktionen und andererseits durch Abpressen von Substrat in Seitenwege, die aus dem glykolytischen System herausführen, das metabolische Bild verwischen.

Daß die Muskelfaserfragmente in großer Menge zugesetztes H6P unter anaeroben und aeroben Bedingungen vorwiegend mit Hilfe der PFK-Reaktion metabolisieren, zeigt die Milchsäurebildung in diesen Experimenten. Abb. 1 gibt die Lactatgehalte nach anaerober und aerober Inkubation mit und ohne $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P als verschieden hohe Säulen wieder. Nach H6P-Zusatz steigen die Lactatgehalte nicht nur anaerob, sondern auch aerob weit über die Vergleichswerte der Versuche ohne Substratzusatz (Abb. 1).

Wie Abb. 1 außerdem zu entnehmen ist, hängt die Milchsäurebildung sowohl von der Gasphase als auch von dem Substratangebot ab. A.C. Aisenberg und V.R. Potter (15) beobachten in einem rekombinierten System aus isolierten Mitochondrien und glykolysierendem Überstand ebenfalls unter Sauerstoff einen Anstieg des Lactatgehalts nach G6P-Zusatz. Diese Befunde weisen auf die sekundäre Bedeutung der Milchsäurebildung im Rahmen des Pasteur-Effekts hin.

Die Metabolitantworten der Muskelfragmente nach Zusatz von $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P (Tab. 2) (Abb. 1) lassen die Konturen eines Mechanismus erkennen, die durch die folgenden experimentellen Maßnahmen verdeutlicht werden können.

Wie E. Meyer (61) nachweist, beschleunigt den Fragmenten zugegebenes AMP in 10^{-2} molarer Konzentration die aerobe Glykogenphosphorolyse auf den anaeroben Wert, den man nach Inkubation ohne AMP-Zusatz mißt. Inkubiert man die Fragmente 60 und 120 Minuten aerob in Phosphatpuffer mit 10^{-2} M

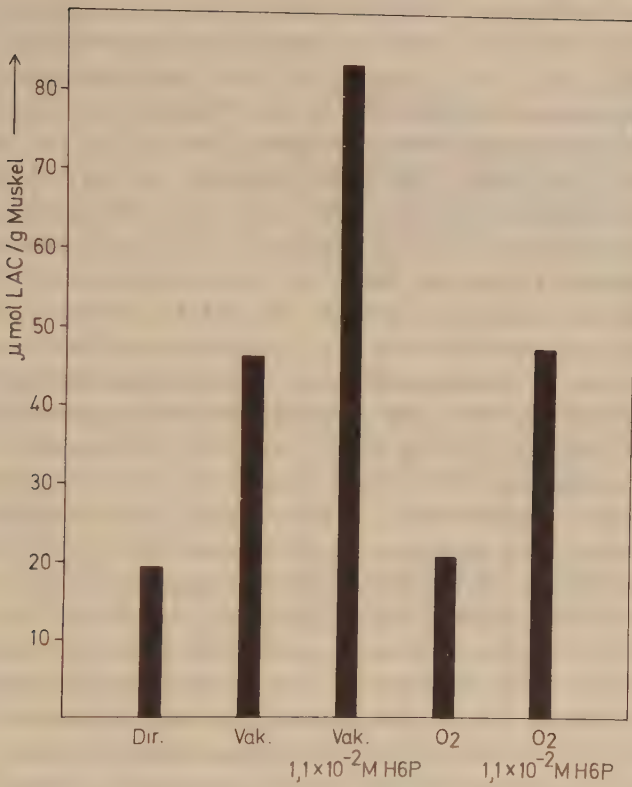


Abb. 1: Anaerobe und aerobe LAC-Bildung nach Inkubation mit und ohne H6P-Zusatz

LAC-Gehalt in $\mu\text{mol/g}$ Muskel nach sofortiger Unterbrechung der Ansätze (= Dir.), sowie nach einstündiger anaerober (= Vak.) und aerober (= O₂) Inkubation mit und ohne $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P in Phosphatpuffer (ph = 7,0) bei +22°C.

AMP, so beobachtet man einen deutlichen, zeitabhängigen Anstieg der LAC-Gehalte gegenüber dem sofort unterbrochenen Nullversuch (Tab. 3). Diese LAC-Werte sind zusammen mit den Glykogengehalten, die E. Meyer (61) unter denselben Versuchsbedingungen bestimmt hat, in Abb. 2 gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Während Glykogen und LAC in den Versuchen ohne AMP-Zusatz über einen Zeitraum von zwei Stunden weitgehend konstant bleiben, verhalten sich Glykogenabbau und Milchsäurebildung in den aerob mit 10^{-2} M AMP inkubierten Fragmenten korreliert (Abb. 2). Durch effektorische Aktivierung der Phosphorylase b mit AMP (38,61) eröffnet sich somit ein experimenteller Weg, die als Pasteur-Effekt auftretende, aerobe glykogenolytische Sperre zu umgehen und durch die Mobilisierung des gespeicherten Glykogens das glykolytische System, das den Abbau dieses Polysaccharids zu LAC nach allgemeiner Auffassung vermittelt, unter Sauerstoff mit Substrat zu beschicken. Da sich dieses Substratangebot in physiologischen Konzentrationsbereichen hält, erscheint es gerechtfertigt, das resultierende glykolytische Metabolitbild auf Geschwindigkeiten glykolytischer Reaktionen zurückzuführen und Seitenwege nicht besonders zu beachten. Im Hinblick auf die hohen LAC-Gehalte nach aerober Inkubation der Fragmente mit 10^{-2} M AMP sind drastische glykolytische Hemmschritte unter diesen Bedingungen auszuschließen. Diese Interpretation entspricht dem bereits erläuterten Befund einer gesteigerten Milchsäurebildung unter Sauerstoff nach Zusatz von $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P (Abb. 1).

Um einen Pasteur-Effekt auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung zu erfassen, werden die Muskelfragmente anaerob und aerob 60 und 120 Minuten in Phosphatpuffer mit 10^{-2} M AMP inkubiert. Die Gegenwart der hohen AMP-Konzentrationen in den Vakuumversuchen soll eine weitgehende Ähnlichkeit der anaeroben und aeroben experimentellen Bedingungen schaffen, so daß sich die Ansätze möglichst nur hinsichtlich der An- und Abwesenheit des molekularen Sauerstoffs

Tab. 3: Anaerobe und aerobe Wirkung des AMP-Zusatzes auf den G6P-, F6P- und LAC-Gehalt

Gehalt an G6P, F6P und LAC und Quotient aus G6P und F6P nach sofortiger Unterbrechung, sowie nach 60 min. und 120 min. anaerober und aerober Inkubation der Muskelfragmente mit 10^{-2} M AMP in Phosphatpuffer (ph = 7,0) bei +22°C. (Mittelwerte aus 3 bis 8 Exp.)

Versuchsbedingungen		$\mu\text{mol/g}$ Muskel				G6P/F6P
Inkubation	Zusätze	G6P	F6P	H6P	LAC	
-	-	2,48	0,52	3,00	19,40	4,6
anaerob	10^{-2} M AMP					
60 min.		0,45	0,10	0,55	67,28	4,8
120 min.		0,58	0,11	0,69	82,77	4,8
aerob						
60 min.		2,87	0,63	3,50	43,54	4,5
120 min.		3,49	0,83	4,32	54,80	4,3

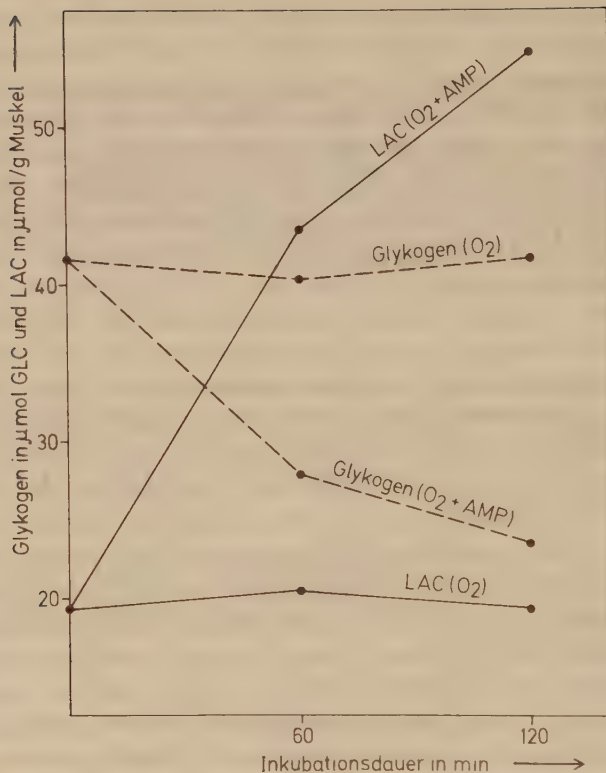


Abb. 2: Aerobe AMP-Wirkung auf Glykogenabbau und LAC-Bildung

Gehalt an Glykogen⁺) (in $\mu\text{mol GLC/g}$) und LAC (Ordinate) nach sofortiger Unterbrechung (= 0 min.), sowie nach 60 min. und 120 min. (Abszisse) aerober Inkubation der Muskelfragmente in Phosphatpuffer ($\text{ph} = 7,0$) mit und ohne 10^{-2} M AMP bei $+22^\circ\text{C}$. (Mittelwerte aus min. 4 Exp.)

⁺) Die Glykogenwerte sind früheren Arbeiten Dr. Erich Meyers entnommen.

unterscheiden. Da die G6P-F6P-Quotienten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nur geringfügig voneinander und von dem Ausgangswert des Nullversuchs abweichen (Tab. 3) und da der PFK-Reaktion unter 10^{-2} M AMP ausreichend Substrat angeboten wird, weisen die höheren H6P-Gehalte, die man aerob gegenüber anaerob findet (Tab. 3), eine Hemmung der F6P-Phosphorylierung unter Sauerstoff, also einen hier lokalisierten Pasteur-Effekt nach.

Die Ergebnisse lassen sich veranschaulichen, indem man die anaeroben und aeroben H6P-Gehalte als Funktion der Zeit darstellt (Abb. 3). Im Vergleich zu dem Anfangswert des Nullversuchs sinkt H6P in den mit 10^{-2} M AMP inkubierten Fragmenten anaerob deutlich ab und erreicht spätestens nach 60 Minuten, wie die geringe Differenz der H6P-Gehalte nach 60 und 120 Minuten zeigt, ein stationäres Niveau. Es bildet sich somit ein Gleichgewicht zwischen Anlieferung und Abtransport von H6P aus, das für eine übereinstimmende Geschwindigkeit von Glykogenphosphorolyse und F6P-Phosphorylierung spricht. Im aeroben Versuch unter 10^{-2} M AMP kommt es dagegen offensichtlich selbst nach längerer Inkubation, wie an dem Anstieg des H6P-Gehalts ersichtlich wird, nicht zu einer solchen Gleichgewichtseinstellung. Demnach verläuft unter diesen Bedingungen der Durchsatz durch die PFK-Reaktion langsamer als die Glykogenphosphorolyse.

Der Pasteur-Effekt, der sich also auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung in den mit AMP behandelten Muskelfaserfragmenten in der aerob-anaeroben Differenz der H6P-Gehalte (Abb. 3, Tab. 3) äußert, läßt sich durch Stoffe manipulieren, die nach E. Meyer (62,63) das Potential des NADH-NAD^+ -Systems verändern. Inkubiert man die Muskelfragmente in Phosphatpuffer 60 Minuten unter Sauerstoff mit 10^{-2} M AMP und $2 \cdot 10^{-3}$ M 5.5-Isoamyl-äthyl-barbitursäure (Amytal), so findet man einen H6P-Gehalt, der zwischen den anaeroben und aeroben Vergleichswerten liegt (Tab. 4). In

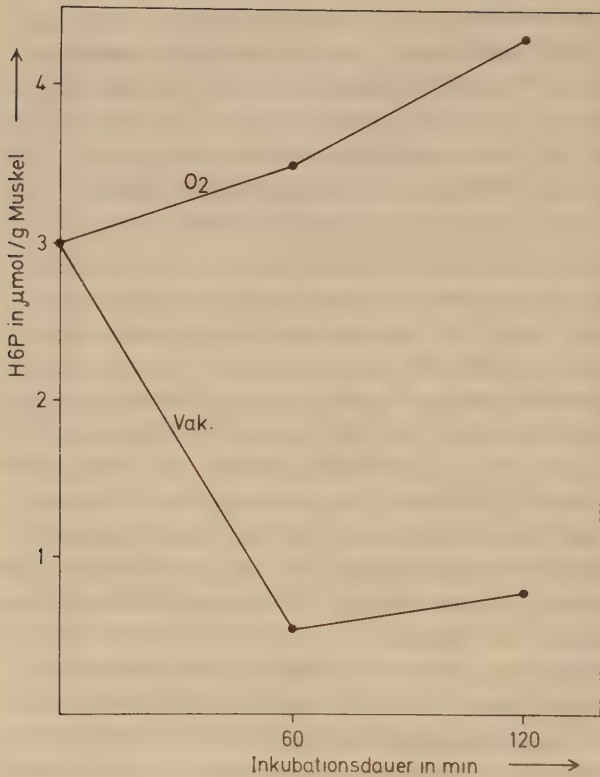


Abb. 3: Anaerober und aerober H6P-Gehalt nach AMP-Zusatz als Zeitfunktion

Gehalt an H6P (Ordinate) nach sofortiger Unterbrechung (= 0 min.), nach 60 min. und 120 min. (Abszisse) anaerober (= Vak.) und aerober (= O₂) Inkubation mit 10^{-2} M AMP in Phosphatpuffer (ph = 7,0) bei +22°C. (Mittelwerte aus 3 bis 5 Exp.)

der genannten Konzentration hemmt das Barbitursäurederivat in den Muskelfaserfragmenten die Oxidation von mitochondrialem NADH durch die Atmung (63). Die Auswirkung auf das cytoplasmatische NADH-NAD^+ -Verhältnis läßt sich durch die Messung des LAC-PY-Quotienten nachweisen, wenn man einem Vorschlag T. Büchers und M. Klingenberg's (45) folgt und das Verhältnis von LAC zu PY als Indikator des cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Potentials benutzt.

Die Muskelfaserfragmente zeigen nach aerober Inkubation mit 10^{-2} M AMP in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal einen höheren LAC-PY-Quotienten und somit ein negativeres cytoplasmatisches NADH-NAD^+ -Potential als in Abwesenheit des Barbitursäurederivats (Tab. 4).

Setzt man den in Phosphatpuffer suspendierten Muskelfragmenten neben 10^{-2} M AMP und $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal noch 10^{-1} M α GP zur Blockierung des α GP-Zyklus zu und inkubiert 60 Minuten unter Sauerstoff, so erreichen der H6P-Gehalt und der LAC-PY-Quotient anaerobe Werte (Tab. 4). In Analogie zum Verhalten der Glykogenphosphorolyse in den Fragmenten (63) beschleunigt somit $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal in Gegenwart von 10^{-1} M α GP die aerobe PFK-Reaktionsgeschwindigkeit auf den anaeroben Vergleichswert.

Daß der Amytaleffekt primär das NADH-NAD^+ -Potential und erst durch seine Vermittlung die PFK-Reaktion betrifft, wird deutlich, wenn man die Fragmente mit $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH in Anwesenheit von 10^{-1} M α GP aerob inkubiert. Wie einem Vergleich der H6P-Gehalte zu entnehmen ist, sind die Zusätze von $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal und $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Geschwindigkeit der F6P-Phosphorylierung austauschbar (Tab. 4). Auf den negativierenden Einfluß, den NADH und α GP zusammen auf das Potential des NADH-NAD^+ -Systems aerob ausüben, weist der LAC-PY-Quotient hin (Tab. 4). Möglicherweise ist das Potential in Gegenwart von 10^{-1} M α GP und $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH allerdings etwas positiver als in Anwesenheit von 10^{-1} M α GP und $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal, soweit man das LAC-PY-Verhältnis als Maßstab verwendet.

Tab. 4: H6P-Gehalte nach AMP-Zusatz bei verschiedenen LAC-PY-Quotienten

H6P-Gehalt und Quotient aus LAC und PY nach anaerober und aerober Inkubation (1 Std; 22°C) in Phosphatpuffer (ph = 7,0) mit 10^{-2} M AMP und verschiedenen Stoffen, die das Redoxpotential des NADH-NAD⁺-Systems quantitativ unterschiedlich negativieren. (Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten.)

Versuchsbedingungen		H6P	LAC/PY
Inkubation	Zusätze	μmol/g Muskel	
anaerob	$1 \cdot 10^{-2}$ M AMP	0,55	325,4
	$1 \cdot 10^{-2}$ M AMP	3,50	43,0
aerob	$1 \cdot 10^{-2}$ M AMP	2,31	57,2
	$2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal		
	$1 \cdot 10^{-2}$ M AMP	0,41	313,3
	$2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal		
	$1 \cdot 10^{-1}$ M αGP		
	$1 \cdot 10^{-2}$ M AMP	0,35	205,8
	$2 \cdot 10^{-3}$ M NADH		
	$1 \cdot 10^{-1}$ M αGP		

In allen Experimenten, in denen den Muskelfaserfragmenten 10^{-2} M AMP zugesetzt wird (Tab. 4), stellen die gemessenen H6P-Gehalte verlässliche Indikatoren der PFK-Reaktionsgeschwindigkeit dar. Denn da Amytal, NADH und α GP nach den Ergebnissen E. Meyers und B. v. Bocks (63) die aerobe Glykogenphosphorolyse in Abwesenheit von 10^{-2} M AMP deutlich beschleunigen, ist es möglich, daß ein Zusatz dieser Stoffe das Substratangebot für die PFK-Reaktion in Gegenwart von 10^{-2} M AMP steigert. Wenn trotzdem unter diesen Bedingungen die H6P-Gehalte fallen, so spricht das um so mehr für eine Beschleunigung der F6P-Phosphorylierung.

Zur weiteren Verdeutlichung des Zusammenhangs zwischen Redoxpotential des NADH-NAD^+ -Paares und PFK-Reaktionsgeschwindigkeit wird H6P in Abb. 4 als Funktion des LAC-PY- und des NADH-NAD^+ -Quotienten dargestellt. Die H6P-Gehalte und die LAC-PY-Verhältniszahlen sind Tab. 4 entnommen. Die NADH-NAD^+ -Quotienten findet E. Meyer (62) unter Versuchsbedingungen, die sich von den hier zugrundegelegten (Tab. 4, Abb. 4) lediglich hinsichtlich Inkubationsdauer und AMP-Zusatz unterscheiden. E. Meyer (62) inkubiert die Muskelfaserfragmente nicht eine, sondern zwei Stunden und gibt kein AMP.

Die beiden Funktionskurven der Abb. 4 entsprechen sich qualitativ weitgehend. Man kann diesen Befund als Hinweis dafür werten, daß sich weder der Zusatz großer AMP-Mengen noch eine Verlängerung der Inkubationszeit um eine Stunde auf die Größe des NADH-NAD^+ -Potentials auswirken. Ob in den Inkubationsversuchen mit Muskelfaserfragmenten der Quotient aus LAC- und PY-Gehalten oder derjenige aus NADH- und NAD^+ -Gehalten den genaueren Indikator des NADH-NAD^+ -Potentials repräsentiert, sei dahingestellt. Da aber nur geringe qualitative Unterschiede bestehen und ein Anstieg der Quotienten mit einem Absinken der H6P-Gehalte verbunden ist (Abb. 4), gibt es nunmehr keinen Zweifel, daß die durch experimentelle Maßnahmen erzwungene Abnahme der Oxidationskraft des NADH-NAD^+ -Systems eine Beschleunigung der PFK-Reaktion in den Muskelfragmenten verursacht.

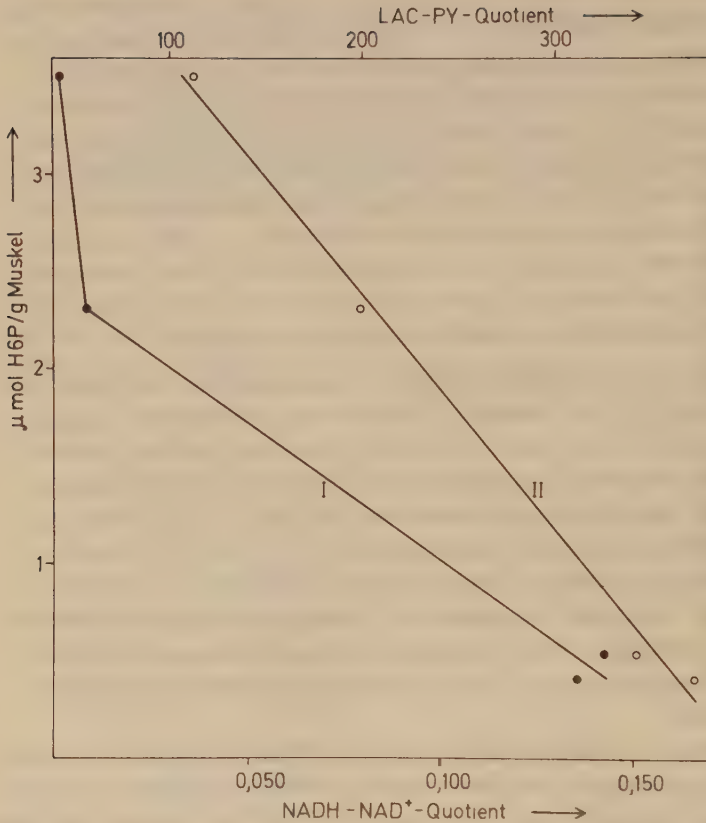


Abb. 4: H6P-Gehalt als Funktion des LAC-PY-Quotienten (I) und des NADH-NAD⁺-Quotienten (II)

H6P-Gehalte und LAC-PY-Quotienten nach anaerober und aerober Inkubation (1 Std.; 22°C) in Phosphatpuffer (pH = 7,0) mit 10^{-2} M AMP, sowie mit und ohne $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal und 10^{-1} M αGP (s. Tab. 4). Zugehörige NADH-NAD⁺-Quotienten s. E. Meyer (62).

Wie sich aus den NADH-NAD^+ -Quotienten (62) (Abb. 4) berechnen läßt, schwankt das Potential des NADH-NAD^+ -Systems zwischen den anaeroben und aeroben Extremwerten um maximal 18 m V. Legt man das Verhältnis von LAC zu PY in den anaerob und aerob mit 10^{-2} M AMP inkubierten Fragmenten zugrunde, so beträgt der entsprechende Wert 26 m V. Die Spannungsangaben erhält man als Differenz der "Ist-Potentiale"^{+) (45), die man ihrerseits aus den NADH-NAD^+ - (62) (Abb. 4) und LAC-PY-Quotienten (Tab. 4) mit Hilfe der Normalpotentiale (79) unter Berücksichtigung des Temperatureinflusses (80) berechnen kann.}

Nachdem es gelungen ist, die Abhängigkeit der PFK-Reaktionsgeschwindigkeit von dem Potential des NADH-NAD^+ -Systems nachzuweisen, ist es möglich, das Verhalten der Muskelfragmente nach Zusatz von $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P besser zu verstehen. Es erscheint jetzt aus Analogiegründen (Tab. 4) gerechtfertigt, den unterschiedlichen Verbrauch des zugegebenen Zuckerphosphats nach Inkubation im Vakuum, sowie unter Sauerstoff in An- und Abwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-1} M α GP (Tab. 2) auf die PFK-Reaktionsgeschwindigkeit zu beziehen, die ihrerseits durch die Größe des Potentials des NADH-NAD^+ -Systems bestimmt wird (Tab. 4, Abb. 4).

Wie die bisher dargestellten experimentellen Daten beweisen, steuert das NADH-NAD^+ -Potential in den Muskelfragmenten das Pasteur-Geschehen auch auf der Stufe der F6P-Phos-

+))

$$E = E_0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{\text{Red}}{\text{Ox}}$$

E = Ist-Potential

E_0 = Normalpotential (ph = 7,0;
t = 22°C)

R = universelle Gaskonstante

T = absolute Temperatur (°K)

F = Faraday-Konstante

n = Wertigkeitswechsel

phorylierung. Unklar ist, wie das geschieht. Die Wirkung des Redoxpotentials könnte am Enzymprotein, möglicherweise mit Hilfe zwischengeschalteter Redoxsysteme stattfinden, sie könnte aber auch durch Effektoren oder die zelluläre ATP-Verteilung kontrollierende Strukturfaktoren vermittelt werden.

Effektoren als Parameter des Pasteur-Geschehens

Die Möglichkeit einer Einbeziehung effektorischer Mechanismen in das Pasteur-Geschehen auf der Stufe der PFK-Reaktion ist nur dann gegeben, wenn den Fragmenten zugesetzte Effektoren die Aktivität glykolytischer Enzyme, vor allem diejenige der hier interessierenden PFK beeinflussen. Der deswegen erforderliche qualitative Nachweis der effektorischen Wirksamkeit in den Fragmenten gelingt ohne weiteres.

Wie bereits in anderem Zusammenhang erläutert wurde, aktiviert zugegebenes AMP die Phosphorylase b (61). Dieses Ergebnis E. Meyers (61) wird in der hier vorliegenden Arbeit häufig experimentell verwertet, um das glykolytische System unter Sauerstoff mit Substrat zu beschicken. Auch die PFK-Aktivität läßt sich effektorisch beeinflussen. Inkubiert man nämlich die Fragmente 60 Minuten im Vakuum in Gegenwart und Abwesenheit von 10^{-2} M AMP, so findet man bei weitgehend übereinstimmenden G6P-F6P-Quotienten nach Zusatz von AMP einen deutlich geringeren H6P-Gehalt als im Vergleichsversuch (Tab. 5). Dieser Befund deutet auf eine PFK-Aktivitätszunahme durch AMP hin. Ein weiteres Beispiel effektorischer Wirkungen stellt der Nachweis der PFK-Hemmung durch Citrat dar (Tab. 5). A. Parmeggiani und R.H. Bowman (41) haben diesen Metaboliten an gereinigtem Enzym aus Kaninchenmuskel als PFK-Inhibitor identifiziert. Nach einstündiger anaerober Inkubation der Muskelfragmente mit 10^{-3} M und 10^{-2} M Citrat äußert sich die inhibitorische Wirkung bei konstanten G6P-F6P-Quotienten und nicht gehemunter Glykogenphosphorolyse (61) in einer von der Kon-

Tab. 5: Wirkung der Effektoren AMP und Citrat

H6P-Gehalt ($\mu\text{mol/g}$ Muskel) und Quotient aus G6P und F6P nach anaerober Inkubation der Muskelfragmente (1 Std., 22°C) mit und ohne AMP und Citrat in Phosphatpuffer ($\text{ph} = 7,0$). (Mittelwerte aus 3 Exp.)

Versuchsbedingungen			
Inkubation	Zusätze	H6P $\mu\text{mol/g}$ Muskel	G6P/F6P
anaerob	-	1,84	4,4
	10^{-2} M AMP	0,55	4,8
	10^{-3} M CIT	7,80	4,6
	10^{-2} M CIT	15,04	4,7

zentration des Citratzusatzes abhängigen H6P-Anreicherung (Tab. 5). Qualitativ ist demnach die effektorische Ansprechbarkeit der PFK in den Fragmenten gesichert. Somit stellt sich die Frage, welche experimentellen Maßnahmen geeignet sind, eine Beteiligung von Effektoren am Pasteur-Geschehen auf der Stufe der PFK-Reaktion nachzuweisen oder zu widerlegen.

Experimente F. Lynens (20), O.H. Lowrys, J.V. Passonneaus, F.X. Hasselbergers und D.W. Schulz' (1), sowie J.R. Williamsons (2) mit verschiedenem Versuchsmaterial zeigen, wie sich in den Zellen nach Sauerstoffentzug oder -zutritt innerhalb weniger Minuten ein neues metabolisches Fließgleichgewicht einstellt. Wenn wir ein ähnliches Verhalten der Muskelfragmente annehmen, so bietet ein Langzeitversuch, also die 60 Minuten dauernde Inkubation, die vorteilhafte Möglichkeit, das untersuchte biologische System über einen

größeren Zeitraum einem weitgehend konstanten "effektorischen Reiz" auszusetzen. Die anschließende quantitative Analyse von Aktivatoren und Inhibitoren der Phosphofructokinase gibt über die Größe und Zusammensetzung dieses Reizes Aufschluß. Gehen in den einzelnen Experimenten unterschiedliche PFK-Reaktionsgeschwindigkeiten mit effektorischen Konzentrationsdifferenzen einher, so identifiziert diese Analogie die entsprechenden Effektoren als mögliche Regulationsparameter. Auf der Basis dieser Überlegungen wollen wir den unterschiedlichen H6P-Durchsatz nach einstündiger Inkubation der Fragmente unter verschiedenen Versuchsbedingungen mit den intrazellulären Konzentrationen einiger Effektoren vergleichen (Tab. 6). In Tab. 6 sind als Aktivatoren unter Einschluß vorwiegend deinhibitorisch wirkender Stoffe FDP (42,43), F6P (43), ADP (42,43) und als Inhibitoren CIT (41), ATP (40) und CP (37) aufgeführt. Die Effektoren AMP (42,43), anorganisches Phosphat (42,43) und PEP (37) wurden weggelassen.

AMP kann deswegen nicht als entscheidender Parameter gelten, da es selbst in unphysiologisch hohen Konzentrationen, die in den Fragmenten die Phosphorylase b maximal aktivieren (61), eine aerobe Hemmung der PFK-Reaktion zuläßt (Tab. 3, Abb. 3). Der Phosphatpuffer, in welchem die Muskelfragmente suspendiert werden, hebt das intrazelluläre Niveau des anorganischen Phosphats um $2,8 \cdot 10^{-2}$ M und somit um das Vierfache des präformierten anaeroben Wertes an (60). Da außerdem nach den Messungen E. Meyers, P.M. Reiserts und B. v. Kuhenheims (60) die anaerob-aerobe Differenz im Phosphatgehalt nach zweistündiger Inkubation der Fragmente in Phosphatpuffer weniger als 10% des anaeroben Wertes beträgt, ist eine Beteiligung dieses PFK-Aktivators am Pasteur-Geschehen auch unter den experimentellen Bedingungen der mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P inkubierten Fragmenten unwahrscheinlich. Ein Verzicht auf den Inhibitor PEP in Tab. 6 erscheint deswegen sinnvoll, weil in hoher Konzentration zugegebenes PEP aerob und an-

Tab. 6: H6P-Verbrauch und effektorische Konzentrationen

H6P-Verbrauch und Konzentration von Effektoren (Aktivatoren, Inhibitoren) in der Muskelsuspension nach anaerober und aerober Inkubation (1 Std., 22°C) mit 10^{-2} M H6P und anderen in der Tabelle aufgeführten Stoffen in Phosphatpuffer (ph = 7,0). (Mittelwerte aus 3 bis 8 Experimenten.)

Versuchsbedingungen Inku- bation	Zusätze	H6P-Ver- brauch $\mu\text{mol/g}$	$\times 10^{-3}$ M					
			Aktivatoren			Inhibitoren		
			FDP	F6P	ADP	CIT	ATP	CP
anaerob	9,4·10 ⁻³ M F6P	31,44	0,38	0,35	0,34	0,01	1,57	0,24
	0,7·10 ⁻³ M G6P							
								38,0
anaerob	9,4·10 ⁻³ M F6P	23,72	0,50	0,75	0,26	0,08	1,70	5,07
	0,7·10 ⁻³ M G6P							
								6,3
aerob	9,4·10 ⁻³ M F6P	36,34	6,50	0,13	0,25	0,18	1,21	3,74
	0,7·10 ⁻³ M G6P							
	2·10 ⁻³ M NADH							
	1·10 ⁻¹ M αGP							36,1
aerob	9,4·10 ⁻³ M F6P	25,74	13,56	0,61	0,25	0,12	1,75	4,28
	0,7·10 ⁻³ M G6P							
	1,4·10 ⁻² M FDP							113,0
	1,4·10 ⁻² M FDP		7,98					

aerob nahezu völlig verschwindet (Tab. 7, Abb. 7) und somit auch nach Zusatz von $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P kaum eine Anreicherung dieses PFK-Hemmstoffes zu erwarten ist.

Nach einstündiger anaerober und aerober Inkubation der Fragmente in Phosphatpuffer mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P äußert sich, wie bereits erläutert wurde, der Pasteur-Effekt in einem aerob verminderten Verbrauch des Zuckerphosphats (Tab. 2, Tab. 6). Diesem Befund stehen Veränderungen der effektorschen intrazellulären Konzentrationen gegenüber, die aus den gemessenen Gehalten des Suspensionsvolumens berechnet werden. Bei einem Vergleich der anaeroben und aeroben Konzentrationen fallen vor allem der 20-fache CP- und 8-fache CIT-Anstieg unter Sauerstoff auf (Tab. 6). Legt man die Ergebnisse K. Uyeda und E. Rackers (37) zugrunde, erscheint eine Beteiligung von CP an der Auslösung des Pasteur-Effekts in den Fragmenten durchaus möglich. Die beiden Autoren (37) hemmen mit $5,5 \cdot 10^{-3}$ M CP, also in einer Konzentration, die derjenigen nach aerober Inkubation mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P entspricht (Tab. 6), die gereinigte PFK aus Kaninchenmuskel zu 72%. Allerdings ist es schon deswegen nicht möglich, sich ohne Vorbehalt auf dieses Ergebnis zu berufen, weil J.V. Passonneau und O.H. Lowry (42) auf der Basis ihrer Experimente CP der Gruppe von Stoffen zuordnen, die keine oder nur schwache effektorische Wirkungen auf die gereinigte Kaninchenmuskel-PFK in physiologischen Konzentrationen ausüben. Im Hinblick auf in-vitro-Versuche könnte auch die aerobe Konzentrationszunahme von CIT für den verminderten H6P-Verbrauch verantwortlich sein. J.V. Passonneau und O.H. Lowry (81) finden mit 200-fach gereinigter PFK aus Schafshirn für CIT einen K_1 -Wert von $3 \cdot 10^{-5}$ M.

Verglichen mit den anaerob-aeroben Unterschieden von CP und CIT treten diejenigen der übrigen Effektoren in den Hintergrund (Tab. 6). Die geringe Differenz der ATP-Konzentrationen nach aerober und anaerober Inkubation der Muskelfaserfragmente mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P (Tab. 6) entspricht den Beob-

achtungen in Hefe (20) und Rattenherz (11). M.L. Salas, E. Vinuela, M. Salas und A. Sols (82) betonen angesichts der Verhältnisse in Hefe (20) die Wichtigkeit des PFK-Inhibitors CIT. Daß auch die FDP-Werte im Vakuum- und Sauerstoffversuch nur wenig voneinander abweichen (Tab.6), ist besonders interessant. Denn dieses Verhalten stellt einen deutlichen Gegensatz zu demjenigen in Mäusehirn nach Auslösen einer Ischämie (1) dar. Dort (1) steigt FDP nach 60 sec. Anoxie auf etwa 400% des Ausgangswertes und übertrifft damit alle übrigen Metabolitantworten. Dieses verschiedene Verhalten von FDP im aerob-anaeroben Übergangsstadium (1) und nach längerer Inkubation (Tab. 6) ist vermutlich Ausdruck der unterschiedlichen Versuchsbedingungen von Kurz- und Langzeitversuchen.

Der Pasteur-Effekt auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung verschwindet in den aerob mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P behandelten Muskelfaserfragmenten, wenn man $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-1} M α GP zusetzt (Tab. 6). Unter diesen Bedingungen steigt der H6P-Verbrauch über den anaeroben Wert; im Vergleich zu den Effektorenkonzentrationen des Sauerstoffversuchs ohne NADH- und α GP-Zusatz fallen die Zunahme von FDP und CIT und das Absinken von F6P auf (Tab. 6). Die Konzentrationsänderungen des PFK-Deinhibitors F6P und des Inhibitors CIT können für den hohen H6P-Verbrauch in Gegenwart von NADH und α GP nicht verantwortlich sein; sie könnten höchstensfalls der Beseitigung des Pasteur-Effekts entgegenwirken. Dagegen besteht durchaus die Möglichkeit, den großen H6P-Schwund in Anwesenheit von NADH und α GP auf den beachtlichen Anstieg der FDP-Konzentration zu beziehen.

Die unterschiedliche PFK-Reaktionsgeschwindigkeit in den bisher beschriebenen drei Experimenten mit H6P-Zusatz (Tab. 6) ließe sich einheitlich mit Hilfe effektorischer Mechanismen erklären, wenn man als entscheidenden kontrollierenden Parameter der PFK-Aktivität den FDP-CIT-Quotienten annehmen würde. In den Versuchen, in denen der Pasteur-

Effekt verschwunden ist, also im Vakuumversuch, sowie nach aerober Inkubation mit H6P, NADH und α GP, findet sich ein größerer FDP-CIT-Quotient als nach aerober Inkubation mit H6P allein (Tab. 6). Die Annahme einer Kontrolle der PFK-Aktivität durch das Verhältnis von FDP zu CIT ist auch deswegen attraktiv, weil sich mit diesem Parameter nicht nur das Verhalten der Muskelfragmente im Langzeitversuch (Tab. 6), sondern auch das des Mäusehirns im Kurzzeitversuch (1,46) erklären ließe.

Die Realisierbarkeit einer solchen effektorischen Kontrolle in den Muskelfragmenten wird durch einen experimentellen Eingriff untersucht, der den FDP-CIT-Quotienten gezielt verändert. Die entsprechende Maßnahme besteht in einer Zufuhr großer FDP-Mengen unter Sauerstoffbedingungen. Da nach einstündiger aerober Inkubation der Fragmente mit $1,4 \cdot 10^{-2}$ M FDP etwa die Hälfte des zugegebenen Metaboliten verschwunden ist (Tab. 6), erscheint die Schlußfolgerung berechtigt, daß der zugesetzte Deinhibitor an den cytoplasmatischen Reaktionsort gelangt und von glykolytischen Reaktionen erfaßt wird. Werden die Fragmente mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P und außerdem $1,4 \cdot 10^{-2}$ M FDP 60 Minuten aerob inkubiert, so unterscheidet sich das effektorische System von demjenigen des Vergleichsversuchs ohne FDP-Zusatz lediglich in bezug auf das Verhältnis von FDP zu CIT (Tab. 6). Obwohl dieser Quotient in den mit FDP behandelten Fragmenten erwartungsgemäß erheblich ansteigt, wird der H6P-Verbrauch nur schwach beschleunigt (Tab. 6). Während es also gelingt, den Pasteur-Effekt auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung mit $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-1} M α GP bei einem FDP-CIT-Quotienten von 36,1 zu beseitigen, ist es nicht möglich, durch experimentelle Maßnahmen, die eine Vergrößerung des FDP-CIT-Quotienten auf einen Betrag von 113 erzwingen, die aerobe Hemmung der PFK-Reaktion spürbar zu vermindern. Somit können Verschiebungen im Verhältnis von FDP zu CIT, die im Vordergrund effektorischer Veränderungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen

stehen (Tab. 6), die Wirkung des NADH-NAD^+ -Potentials in dem Sauerstoffversuch mit $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-1} M αGP nicht vermittelt haben.

Ein Vergleich der Ergebnisse nach aerober Inkubation in Gegenwart von $1,4 \cdot 10^{-2}$ M FDP mit und ohne $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P eröffnet interessante Aspekte hinsichtlich effektorischer Wirkungen in den Muskelfragmenten. Der H6P-Zusatz erhöht die FDP-Konzentration auf fast das Doppelte des Wertes, der nach Inkubation mit FDP allein erreicht wird (Tab. 6). Dieser Befund deutet auf die quantitativ erhebliche Beteiligung der PFK-Reaktion an der Auffüllung des FDP-Pools unter der Bedingung eines ausreichend großen H6P-Angebots hin. Damit dürfte in dem Sauerstoffversuch nach Zusatz von $1,4 \cdot 10^{-2}$ M FDP und $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P auch bei gegebener intrazellulärer Metabolitkompartimentierung die FDP-Konzentration am Reaktionsort etwa so hoch sein wie die Gesamtkonzentration. Da FDP in vitro bereits in 10^{-6} M Konzentration deutlich deinhibitorische Wirkungen an gereinigten Enzymen zeigt (42,43), ist seine relative Wirkungslosigkeit in den Muskelfragmenten bei $1,4 \cdot 10^{-2}$ M Konzentration (Tab. 6) erstaunlich. Eine der möglichen Ursachen dieses Befundes stellt eine Verminderung der Affinität der glykolytischen Enzyme gegenüber Effektoren in den Muskelfragmenten dar. Eine solche Vorstellung liegt im Hinblick auf die Untersuchungen P. Özands, H.T. Naraharas und C.F. Coris (53) nahe. So besitzt Hexokinase in morphologisch intakten Froschsartorien gegenüber Glucose eine Affinität von $K_M 2 \cdot 10^{-3}$ M, während das Enzym in Sartoriusextrakt bei $9 \cdot 10^{-5}$ M Glucose eine halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit zeigt (53). In diesem Zusammenhang sei an die Vakuumversuche mit Citrat erinnert (Tab. 5). Ein Zusatz von 10^{-3} M CIT führt in den Muskelfragmenten unter anaeroben Bedingungen zu einer deutlichen PFK-Hemmung. Dieser inhibitorische Effekt wird durch eine Erhöhung der CIT-Konzentration verstärkt (Tab. 5). Somit dürfte der K_i -Wert der PFK gegenüber

CIT in den Muskelfragmenten um Größenordnungen über demjenigen liegen, den J.V. Passonneau und O.H. Lowry (81) mit 200-fach gereinigter Schafshirn-PFK *in vitro* finden und mit $K_1 = 3 \cdot 10^{-5}$ M angeben. Von einem ähnlichen Befund berichtet E. Meyer (61). Er bestimmt in den Muskelfragmenten unter Sauerstoffbedingungen die Affinität von Phosphorylase b gegenüber AMP. Ein halbmaximaler Effekt stellt sich bei Zusatz von $5 \cdot 10^{-3}$ M AMP ein (61). Demgegenüber messen H.E. Morgan und A. Parmeggiani (38) mit dem kristallisierten Enzym aus Kaninchenmuskel eine Affinität von $K_M = 9 \cdot 10^{-5}$ M. Der Befund einer Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Ergebnissen erleichtert die Interpretation des Sauerstoffversuchs, in dem die Muskelfragmente 60 Minuten mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P und $1,4 \cdot 10^{-2}$ M FDP inkubiert werden. Die relative Wirkungslosigkeit der hohen FDP-Konzentration, die hier am Reaktionsort der F6P-Phosphorylierung bestehen muß, läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückführen, daß die PFK-Inhibitoren ATP und CIT unter diesen Versuchsbedingungen zu niedrig konzentriert sind, um eine PFK-Hemmung auslösen zu können. Entsprechend kann hier zwar die schwache aktivierende (43), nicht aber die starke deinhibitierende Wirkkomponente (43) des Effektors FDP die PFK-Aktivität beeinflussen. Gerade im Hinblick auf dieses Experiment ist eine Beteiligung von Effektoren am Pasteur-Effekt auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung in den Muskelfaserfragmenten kaum vorstellbar.

Zur Veranschaulichung der in Tab. 6 zusammengetragenen Ergebnisse werden in Abb. 5a H6P-Verbrauch und Effektorenkonzentrationen über den jeweiligen Versuchsbedingungen als Punkte aufgezeichnet, die durch Geraden miteinander verbunden werden. So erhält man Kurven, die man auf möglicherweise vorhandene Korrelationszusammenhänge untersuchen kann. Wie Abb. 5a zeigt, ist nur zwischen H6P-Verbrauch als Maß für die PFK-Reaktionsgeschwindigkeit und Konzentrationsänderung des Effektors F6P insgesamt eine Korrelation gegeben; einer

Konzentrationszunahme des Deinhibitors F6P steht erwartungsgemäß eine Verminderung der H6P-Durchsatzrate gegenüber. Während in Abb. 5a die Versuchsbedingungen, unter denen die aufgetragenen Meßdaten gewonnen werden, ersichtlich sind, werden in Abb. 5b die Ergebnisse der Tab. 6 benutzt, um Funktionskurven zu zeichnen, und zwar wird der H6P-Verbrauch als Funktion effektorischer Konzentrationen dargestellt.

Besondere Beachtung erfordert die effektorische Situation in den Inkubationsversuchen mit 10^{-2} M AMP, denn in diesen Experimenten erreicht die ATP-Konzentration, vermutlich infolge einer AMP-Dismutation und einer gesteigerten Atmungsphosphorylierung, höhere Werte als in vergleichbaren anderen Sauerstoffversuchen (Abb. 8). In Abb. 6 sind die H6P-Gehalte, die ATP- und FDP-Konzentrationen dargestellt, die die quantitative Metabolitanalyse der Muskelsuspension nach einstündiger aerober Inkubation mit 10^{-2} M AMP und weiteren Zusatzstoffen ergibt. Wie Abb. 6 verdeutlicht, bestehen zwischen den H6P-Gehalten, die als Maß für die PFK-Reaktionsgeschwindigkeit dienen, und den Effektoren FDP und ATP insgesamt keine positiven Korrelationen. Besonders interessant ist ein Vergleich der Sauerstoffversuche mit und ohne $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal. Das Absinken des H6P-Gehalts in Gegenwart des Barbitursäurederivats läßt sich weder auf FDP- noch ATP-Konzentrationsänderungen beziehen (Abb. 6).

Die experimentelle Beschäftigung mit effektorischen Wirkungen führt nicht nur zum Ausschluß einer effektorischen Beteiligung am Pasteur-Geschehen auf der Stufe der F6P-Phosphorylierung in den Muskelfragmenten. Da die Effektoren erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen wirksam werden, besitzen sie in dem hier untersuchten biologischen System keine "Trigger"-Eigenschaften (26). Es erscheint deswegen sehr fraglich, ob sie sich überhaupt in den Fragmenten an Regelkreisen beteiligen können.

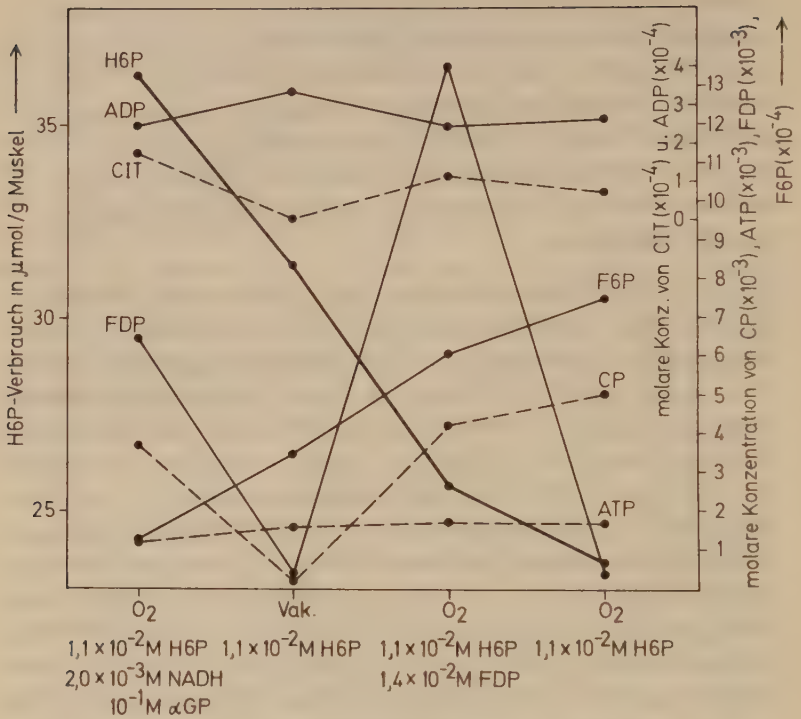


Abb. 5a: H6P-Verbrauch und effektorische Konzentrationen
H6P-Verbrauch und effektorische Konzentrationen nach Inkubation (1 Std., 22°C) mit 10⁻² M H6P und verschiedenen Zusatzstoffen in Phosphatpuffer (ph = 7,0). (Mittelwerte aus 3 bis 8 Exp.)
Ordinate: links H6P-Verbrauch in μmol/g
rechts molare effektorische Konz.
Abszisse: Gasphase (anaerob = Vak.; aerob = O₂) und Zusatzstoffe
Die den jeweiligen Versuchsbedingungen zuzuordnenden Ordinatenwerte werden durch Geraden (gestrichelt: Inhibitoren, schwach durchgezogen: Aktivatoren, stark durchgezogen: H6P-Verbrauch) miteinander verbunden.

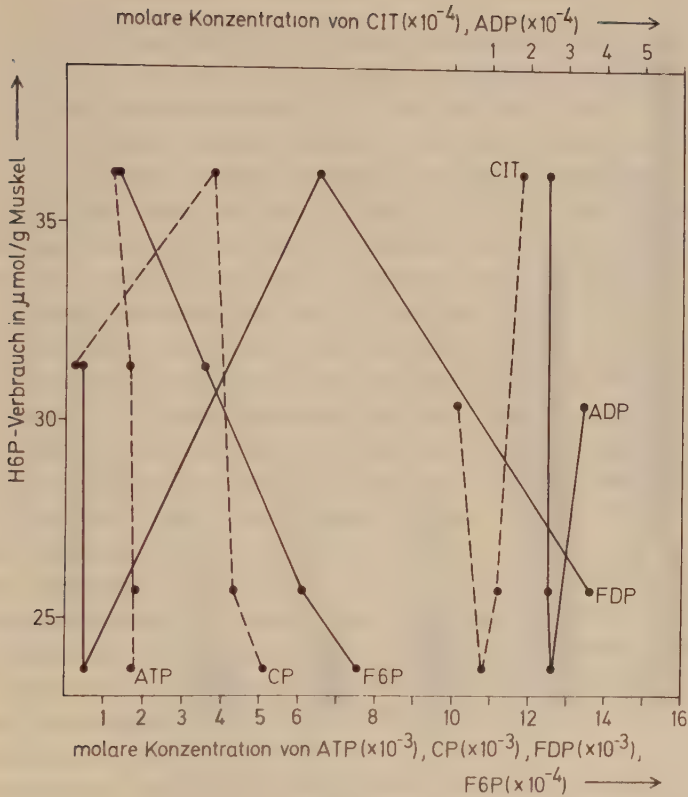


Abb. 5b: H6P-Verbrauch als Funktion effektorischer Konzentrationen

H6P-Verbrauch und Effektorenkonzentrationen nach aerober und anaerober Inkubation (1 Std.: 22°C) mit H6P, NADH, α GP und FDP entsprechend den Angaben der Tab. 6. Inhibitoren der PFK: gestrichelt; Aktivatoren: durchgezogen.

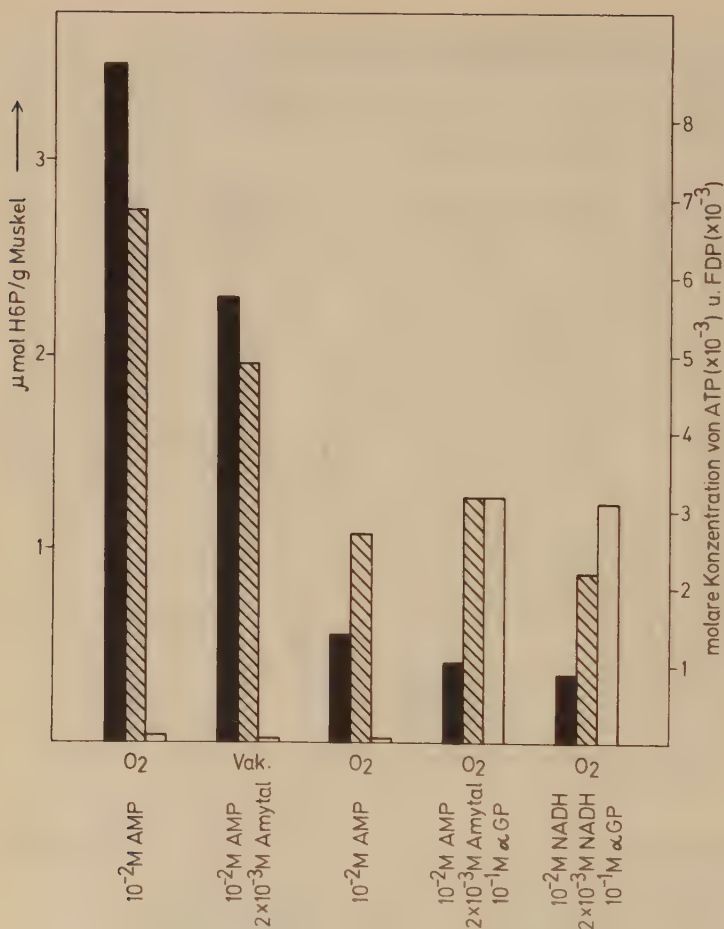


Abb. 6: H6P-Gehalt und Konzentration der Effektoren ATP und FDP.

H6P-Gehalt (schwarze Säulen) und Konzentration der Effektoren ATP (schraffierte Säulen) und FDP (leere Säulen) nach anaerober und aerober Inkubation (1 Std.; 22°C) in Phosphatpuffer (ph = 7,0) mit 10^{-2} M AMP und verschiedenen, besonders aufgeführten Zusätzen.

Phosphofructokinase-Reaktion und glykolytische ATP-Synthese

Die bisher dargestellten Ergebnisse würden sich noch eindeutiger auswerten lassen, wenn man wüßte, ob in den beschriebenen Experimenten der Grad der Sättigung des Enzyms PFK mit seinem Cosubstrat ATP eine entscheidende Rolle spielt, ob also beispielsweise die aerobe Hemmung des H₆P-Verbrauchs (Tab. 2, Tab. 6, Abb. 5a) auf einen ATP-Mangel zurückgeht. Möglicherweise erhöhen die aerob zugesetzten Stoffe Amytal, NADH und α GP die ATP-Konzentration am Ort der F₆P-Phosphorylierung, so daß die PFK zu einem größeren Prozentsatz mit Cosubstrat gesättigt ist und entsprechend in der Zeiteinheit mehr Substrat metabolisiert. Eine solche Vorstellung setzt zumindest bei den Versuchen mit $1,1 \cdot 10^{-2} M$ H₆P angesichts der geringen Unterschiede der angegebenen ATP-Konzentration (Tab. 6, Abb. 5a) eine ATP-Kompartimentierung auf der Basis intrazellulärer Permeabilitätsschranken voraus.

An der aeroben Hemmung der F₆P-Phosphorylierung infolge eines ATP-Mangels könnten als Ursachen eine ATP-Retention der Mitochondrien (19,33), eine cytoplasmatische Kammerung (20) und eine Verlangsamung der glykolytischen ATP-Synthese, beispielsweise auf Grund eines ADP-Mangels (20), beteiligt sein.

Wie in der Einleitung ausführlich erläutert wurde, findet F. Lynen (20) in Versuchen mit Bäckerhefe Hinweise, die es ermöglichen, den Pasteur-Effekt auf der Stufe der PFK-Reaktion auf eine cytoplasmatische Kammerung, die die Verwertung von mitochondrial gebildetem ATP verhindert, und eine cytoplasmatische Verarmung an anorganischem Phosphat und ADP zurückzuführen. Nach F. Lynens (20) Auffassung entscheidet die Geschwindigkeit der Atmungsphosphorylierung über die cytoplasmatische Phosphat- und ADP-Konzentrationen, bestimmt somit die glykolytische ATP-Syntheserate und kontrolliert in der Folge dadurch die Geschwindigkeit der PFK-Reaktion vollständig.

Mit der Frage, ob diese Vorstellungen F. Lynens (20) für die Muskelfragmente Gültigkeit besitzen, haben wir uns experimentell auseinandergesetzt.

Wie Abb. 1 zeigt, entsteht nach 60 Minuten aerober Inkubation der Fragmente in Phosphatpuffer mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P so viel Milchsäure wie in dem vergleichbaren Vakuumversuch ohne Substratzusätze. Angesichts dieser Ergebnisse ist eine drastische Hemmung der glykolytischen ADP-Phosphorylierung in den aerob mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P behandelten Muskelfaserfragmenten unwahrscheinlich. Demnach sind in diesem Sauerstoffversuch anorganisches Phosphat und ADP zumindest bis zu einem bestimmten Ausmaß für die Glykolyse verfügbar. Die Möglichkeit eines Phosphatmangels scheidet mit großer Wahrscheinlichkeit schon deswegen aus, weil den Muskelfragmenten, wie bereits im methodischen Teil dieser Arbeit ausgeführt wurde, in allen Versuchen anorganisches Phosphat in einer Konzentration zugesetzt wird, die dem vierfachen präformierten anaeroben Wert entspricht (60). Das zugegebene Phosphat beschleunigt die Glykogenphosphorolyse und LAC-Bildung anaerob erheblich und steigert deutlich die aerobe CP-Synthese (60), gelangt also offensichtlich in den cytoplasmatischen Raum. Sollte in den Muskelfragmenten die Möglichkeit einer Harden-Young-Gärung (21) bestehen, so könnte ein an sich gegebener aerober ADP-Mangel, den Auffassungen F. Lynens (20) entsprechend, in Gegenwart der hohen Phosphatkonzentrationen auf Kosten einer FDP-Anreicherung ausgeglichen werden. Der Befund der gesteigerten LAC-Bildung unter Sauerstoff nach H6P-Zusatz (Tab. 2) läßt somit keine Schlußfolgerung hinsichtlich einer ADP-Kompartimentierung zu. Die Klärung dieser Frage erfolgt durch die Untersuchung der Pyruvatkinase-Reaktion, die unmittelbar unabhängig von anorganischem Phosphat abläuft, ADP benötigt und ATP freisetzt.

Eine geeignete experimentelle Maßnahme, die Aufschluß über den Substratdurchsatz der PK-Reaktion gibt, besteht darin,

die GAPDH-Reaktion mit Bromessigsäure zu hemmen und den Muskelfaserfragmenten 3-Phosphoglycerat unter anaeroben und aeroben Bedingungen anzubieten. Zur weitgehenden Blockierung der GAPDH-Reaktion wird Bromessigsäure unter Berücksichtigung der Ergebnisse E. Meyers (62) in $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Konzentration eingesetzt. In Tab. 7 ist die Summe der Gehalte an 3PG, 2PG und PEP nach einstündiger anaerober und aerober Inkubation mit $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Bromessigsäure und $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ 3PG wiedergegeben. Die gefundenen Werte betragen im Vakuumversuch 7,0% und im Sauerstoffversuch 13,0% der zugesetzten $16,7 \text{ } \mu\text{mol}$ 3PG/g Muskel (Tab. 7). Für diesen 3PG-Schwund dürften in erster Linie abbauende Reaktionen der Glykolyse unter Einbeziehung der PK-Reaktion verantwortlich sein. Dementsprechend widerspricht das Ergebnis des großen 3PG-Verbrauchs unter Sauerstoff der Möglichkeit einer wirksamen ADP-Limitierung der PK-Reaktionsgeschwindigkeit unter diesen experimentellen Bedingungen.

Tab. 7: Anaerober und aerober Verbrauch von zugesetztem 3PG nach Vergiftung mit Bromessigsäure

Gehalt an 3PG + 2PG + PEP in $\mu\text{mol/g}$ Muskel nach anaerober und aerober Inkubation (1 Std., 22°C) in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7,0$) mit $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ BrH_2CCOOH und $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ 3PG (= $16,73 \text{ } \mu\text{mol}$ 3PG/g Muskel). (Mittelwerte aus 4 Exp.)

Versuchsbedingungen		3PG + 2PG + PEP	
Inkubation	Zusätze	in $\mu\text{mol/g}$	in % der 3PG-Zusatzmenge
anaerob	$5 \cdot 10^{-4} \text{ M BrH}_2\text{CCOOH}$ $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ M 3PG}$	1,17	7,0
aerob		2,18	13,0

Noch eindeutige Hinweise ergeben sich, wenn man die Enolase in den Muskelfaserfragmenten hemmt, Phosphoenolpyruvat zusetzt und seine Metabolisierung unter Sauerstoff und im Vakuum beobachtet. Die Enolase-Hemmung gelingt mit 10^{-2} M NaF. In dieser Konzentration verhindert NaF, selbst im zweistündigen anaeroben Inkubationsversuch, einen Anstieg des Milchsäuregehalts über den Ausgangswert hinaus, führt dagegen aber zu einer Anreicherung von 3PG und 2PG. Inkubiert man 60 Minuten mit $9,4 \cdot 10^{-3}$ M PEP und 10^{-2} M NaF, so verschwinden in dieser Zeit von den zu Inkubationsbeginn vorhandenen 33,55 μmol PEP/g Muskel anaerob 33,52 $\mu\text{mol/g}$, und aerob 31,33 $\mu\text{mol/g}$, während die PY- und LAC-Gehalte deutlich zunehmen (Tab. 8, Abb. 7).

Tab. 8: Anaerobe und aerobe Metabolisierung von zugesetztem PEP in PY und LAC nach NaF-Vergiftung

Gehalt an PEP, PY und LAC (in $\mu\text{mol/g}$ Muskel), PEP-Verbrauch (in $\mu\text{mol/g}$ und in % des anaeroben Durchsatzes) nach sofortiger Unterbrechung der Ansätze, sowie nach anaerober und aerober Inkubation der Muskelfragmente (1 Std., 22°C) mit 10^{-2} M NaF und $9,4 \cdot 10^{-3}$ M PEP in Phosphatpuffer (pH = 7,0).
(Mittelwerte aus 3 Exp.)

PEP-Menge zu Inkubationsbeginn: 33,55 $\mu\text{mol/g}$ Muskel (= zugesetzte + präformierte Menge)

Versuchsbedingungen		$\mu\text{mol/g}$ Muskel			PEP-Verbrauch	
Inkubation	Zusätze	PEP	PY	LAC	in $\mu\text{mol/g}$	in % des anaeroben Durchsatzes
-	-	0,09	0,15	18,82	-	-
anaerob	$1 \cdot 10^{-2}$ M NaF $9,4 \cdot 10^{-3}$ M PEP	0,02	4,91	40,82	33,52	100,0
aerob		2,22	19,37	19,83	31,33	93,5

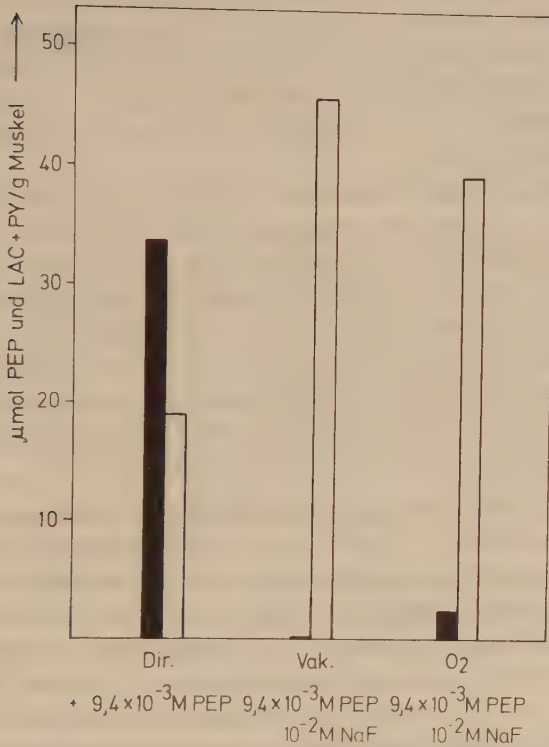


Abb. 7: Anaerobe und aerobe Metabolisierung von zugesetztem PEP in PY und LAC nach Vergiftung mit NaF

Gehalt an PEP (schwarze Säulen) und LAC + PY (leere Säulen) in $\mu\text{mol/g}$ Muskel nach sofortiger Unterbrechung der Ansätze (dir.), sowie nach anaerober (= Vak.) und aerober (= O₂) Inkubation (1 Std., 22°C) mit 10^{-2} M NaF und $9,4 \cdot 10^{-3}$ M PEP in Phosphatpuffer (ph = 7,0).

PEP-Gehalt zu Inkubationsbeginn (= dir.): präformierte + zugesetzte Menge = 33,55 $\mu\text{mol/g}$ Muskel.

Wie dieser Befund des PEP-Schwunds und der PY- und LAC-Entstehung (Tab. 8, Abb. 7) bei gegebener Enolase-Hemmung beweist, gelangt das angebotene Substrat sowohl im Sauerstoff- als auch im Vakuumversuch mit ausreichend großer Diffusionsgeschwindigkeit an den Ort der PK-Reaktion, wird von ihr erfaßt und metabolisiert.

Auf den geringen anaerob-aeroben Unterschied des PEP-Verbrauchs soll in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden. Das Resultat des hohen aeroben Durchsatzes von Phosphoenolpyruvat (Tab. 8, Abb. 7) entspricht dem Ergebnis des großen 3-Phosphoglycerat-Verbrauchs in den aerob mit Bromessigsäure und 3-Phosphoglycerat inkubierten Muskelfaserfragmenten (Tab. 7). Auch in dem Sauerstoffversuch mit Phosphoenolpyruvat- und NaF-Zusatz besteht demnach kein spürbarer ADP-Mangel am Ort der Pyruvatkinase.

Dieser Befund läßt nicht ohne weiteres den Schluß zu, daß auch in den aerob mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P behandelten Muskelfaserfragmenten ADP von vornherein, also unabhängig von einer Harden-Young-Gärung, in großen Mengen für die glykolytischen Reaktionen verfügbar ist. Eine solche Schlußfolgerung ist auf der Basis der Vorstellungen F. Lynens (20) nur möglich, wenn die Muskelfaserfragmente in den zu vergleichenden Sauerstoffversuchen ein übereinstimmendes intrazelluläres ADP-Verteilungsmuster aufweisen, wenn also die ADP-Gehalte und die Geschwindigkeiten der Atmungsphosphorylierung nicht oder wenig voneinander abweichen.

Als Maßstab für die Phosphorylierungsrate der Atmung dient nach einem Vorschlag E. Meyers (24) die Summe der Gehalte an CP und ATP. Die Verwendung dieses Indikators erscheint auch im Hinblick auf Ergebnisse von B. Chance und G. R. Williams (30), sowie H.A. Lardy und H. Wellman (83) sinnvoll. Da nach B. Chance und G.R. Williams (30) ADP die Atmungsgeschwindigkeit isolierter Mitochondrien und intakter Zellen kontrolliert, führt eine Freisetzung von ADP aus ATP in Gegenwart von Sauerstoff und Substrat zu einer Atmungsaktivierung. Dementsprechend erhöhen H.A. Lardy und H. Wellman (83)

den Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien, indem sie Phosphataktzeptorsysteme wie das Creatin-Creatinkinase-System zusetzen. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen ist anzunehmen, daß bei intakter Atmung in Gegenwart von Sauerstoff und Substrat die Gleichgewichtslage der Creatinkinase-Reaktion in Richtung der Produkte CP und ADP verschoben wird.

Wie Abb. 8 zeigt, findet man nach einstündiger anaerober Inkubation der Muskelfaserfragmente mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P als Summe der Gehalte an CP und ATP nur 6,42 $\mu\text{mol/g}$ Muskel. Dagegen steigt nach 60 Minuten Inkubation unter Sauerstoff mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P der Gehalt von CP und ATP zusammen auf 24,11 $\mu\text{mol/g}$ Muskel. Diese Zunahme der beiden energiereichen Phosphate geht im Wesentlichen auf die CP-Bildung zurück (Abb. 8). Demnach ist nur die Geschwindigkeit der Atmungsphosphorylierung ausreichend hoch, um den CP-Speicher aufzufüllen.

Im Einklang mit den bisher beschriebenen Überlegungen steht der erhebliche Anstieg von CP und ATP nach einstündiger aerober Inkubation mit 10^{-2} M AMP (Abb. 8). Vermutlich wirkt sich hier die AMP-Dismutation aus.

Wie die hohen CP- und ATP-Gehalte zeigen (Abb. 8), ist die Atmungsphosphorylierung in den aerob mit $9,4 \cdot 10^{-3}$ M PEP und 10^{-2} M NaF inkubierten Muskelfaserfragmenten nicht gehemmt. Nach Zusatz von NaF und PEP erreichen die beiden energiereichen Phosphate unter Sauerstoff sogar Werte, die über denjenigen liegen, die man nach aerober Inkubation mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P findet (Abb. 8).

In allen dargestellten Sauerstoffversuchen differieren die ADP-Gehalte nur wenig (Abb. 8).

Diese in Abb. 8 veranschaulichten Ergebnisse gestatten nunmehr die Annahme, daß ADP in den aerob mit H6P inkubierten Muskelfaserfragmenten in gleichem Ausmaß für die glykolytische Substratdephosphorylierung zur Verfügung steht wie in dem Sauerstoffverbrauch mit PEP- und NaF-Zusatz. Der

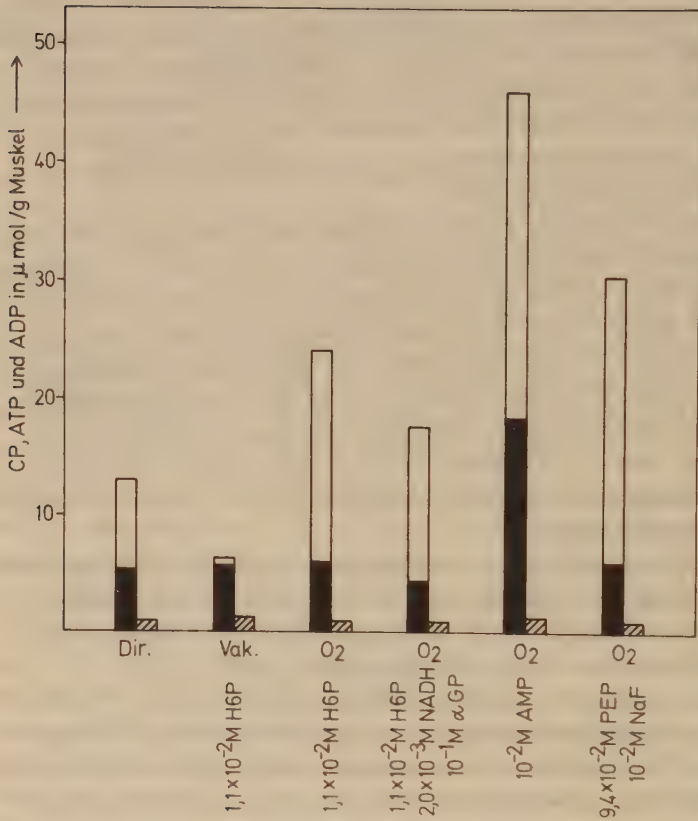


Abb. 8: CP, ATP und ADP unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Gehalt an CP (leere Säulen), ATP (schwarze Säulen) und ADP (schraffierte Säulen) in $\mu\text{mol/g}$ Muskel nach sofortiger Unterbrechung (= dir.) und nach anaerober (= Vak.) und aerober (= O₂) Inkubation (1 Std., 22°C) in Phosphatpuffer (ph = 7,0) mit verschiedenen Zusatzstoffen (Abszisse).

große Verbrauch des unter Sauerstoff und NaF angebotenen Phosphoenolpyruvats schließt somit einen wirksamen ADP-Mangel an den glykolytischen Reaktionsorten in den aerob mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P behandelten Muskelfaserfragmenten aus.

Abb. 8 enthält noch einen weiteren interessanten Hinweis in diesem Zusammenhang. Nach 60 Minuten aerober Inkubation der Muskelfaserfragmente mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P, $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-1} M α GP findet man mehr CP und ATP, dagegen weniger ADP als nach einstündiger anaerober Inkubation mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P (Abb. 8). Wenn es richtig ist, daß die Geschwindigkeit der Atmungsphosphorylierung die intrazelluläre Phosphat- und ADP-Verteilung bestimmt, dann ist in dem Sauerstoffversuch eine geringere cytoplasmatische Phosphat- und ADP-Konzentration als in dem Vakuumversuch anzunehmen. Auf der Basis der Vorstellungen F. Lynens (20) sollte man dementsprechend unter aeroben Bedingungen nach H6P-, NADH- und α GP-Zusatz einen geringeren H6P-Durchsatz als in dem anaeroben Experiment erwarten. Wie Tab. 2 zeigt, metabolisieren die Muskelfaserfragmente in Wirklichkeit aber umgekehrt aerob in Gegenwart von $1,1 \cdot 10^{-2}$ M H6P, $2 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-1} M α GP mehr H6P als unter anaeroben Bedingungen nach H6P-Zusatz.

Dieser Befund läßt sich ebenso wenig wie die übrigen Ergebnisse, welche die Untersuchung der Pyruvatkinase-Reaktion erbrachte (Tab. 7, Tab. 8, Abb. 7, Abb. 8), mit den Vorstellungen F. Lynens (16,17,19,20) vereinbaren. Muskelfaserfragmente verhalten sich offensichtlich anders als die von F. Lynen untersuchte Hefe.

Somit läßt sich also der Pasteur-Effekt auf der Stufe der PFK-Reaktion in den Muskelfaserfragmenten weder als Folge eines Cosubstratmangels im Sinne der Deutung F. Lynens (20) noch auf der Basis effektorischer Wirkungen erklären. Andererseits wurde die Korrelation zwischen PFK-Reaktionsgeschwindigkeit und $\text{NADH} \cdot \text{NAD}^+$ -Quotienten eindeutig nachgewiesen (Abb. 4). Deswegen erscheint es nun berechtigt, eine

unmittelbare Beziehung zwischen der Aktivität des katalysierenden Enzyms und dem NADH-NAD^+ -Potential zu postulieren.

Aerobe Hemmung der Hexokinase-Reaktion

Die bisher erläuterten Untersuchungen betreffen Reaktionen, die an der Metabolisierung von Glykogen zu PY und LAC beteiligt sind. Damit ist bislang eine im Rahmen des Pasteur-Geschehens wichtige Reaktion ausgelassen, nämlich die Einschleusung von Glucose in das glykolytische System.

Die experimentelle Auseinandersetzung mit der Glucose-Phosphorylierung wird durch die pH-Empfindlichkeit dieser Reaktion in den Muskelfragmenten erschwert.

In 60 Minuten anaerober Inkubation mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M Glucose in Phosphatpuffer, der auf pH = 6,6, beziehungsweise pH = 7,3 eingestellt wird, verbrauchen die Fragmente in dem angesäuerten Milieu nur 1,7 μmol Glucose/g Muskel, in der alkalisierten Suspension dagegen 6,7 μmol /g (Tab. 9). Bei Verwendung des auf pH = 6,6 eingestellten Phosphatpuffers findet man nach einstündiger Vakuuminkubation mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC pH = 6,52 in der Muskelsuspension; in dem Vergleichsversuch mit dem auf pH = 7,3 eingestellten Puffer wird pH = 6,81 gemessen (Tab. 9). Wenn man davon ausgeht, daß die glykolytischen Reaktionen in qualitativer und quantitativer Hinsicht eine dominierende Stellung im Kohlenhydratabbau einnehmen, ist die Annahme berechtigt, daß die HK-Reaktion den GLC-Verbrauch kontrolliert. Dementsprechend zeigt das Ergebnis des im Sauer gehemmten GLC-Schwunds eine pH-Wirkung auf die HK-Reaktion. Von einer ähnlichen Beobachtung berichtet S.P. Colowick (84). Er beschreibt einen HK-Aktivitätsverlust in wäßrigen Muskelextrakten, der bei pH = 6, nicht dagegen bei pH = 7 eintritt. Der Mechanismus ist unklar. Möglicherweise wirkt die Alkalisierung der Muskelsuspension durch die Annäherung an das pH-Optimum des Enzyms aktivitätssteigernd. Nach R.K.

Crane und A. Sols (85) besitzt die Kalbshirn-HK ein breites ph-Optimum zwischen $\text{ph} = 6,0$ und $\text{ph} = 8,0$, verhält sich also relativ ph-unabhängig, während das Enzym aus dem Skelettmuskel der Ratte und des Hundes ein ph-Optimum nahe $\text{ph} = 8$ zeigt.

Tab. 9: ph-Abhängigkeit des GLC-Verbrauchs

GLC-Gehalt und -Verbrauch nach sofortiger Unterbrechung der Ansätze und nach 60 min. anaerober Inkubation der Muskelfragmente (22°C) mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC in Phosphatpuffer ($\text{ph} = 6,6$ und $\text{ph} = 7,3$)

GLC-Gehalt zu Inkubationsbeginn: $17,69 \mu\text{mol/g}$
(= präformierte + zugesetzte Menge)

Versuchsbedingungen		ph ⁺⁾	GLC-Verbrauch			ph nach der Inkubation
Inkubation	Zusätze		GLC $\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	in % der Anfangsmenge	
-	-	7,0	0,96			7,07
Anaerob $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC		6,6	15,99	1,70	9,6	6,52
		7,3	10,96	6,73	38,0	6,81

+) ph des Phosphatpuffers

Die experimentellen Schlußfolgerungen aus dem Befund der ph-Abhängigkeit des Glucoseverbrauchs bestehen darin, die Fragmente bei der Untersuchung der HK-Reaktion nicht wie in den übrigen Experimenten dieser Arbeit in neutralem, sondern in einem auf $\text{ph} = 7,3$ eingestellten Phosphatpuffer zu suspendieren und außerdem die ph-Werte in den Muskelsuspensionen nach Ablauf der Versuche vor der Eiweißfällung zu messen.

Tab. 10: GLC-Verbrauch im Vakuum, sowie unter Sauerstoff in An- und Abwesenheit von zugesetztem Amytal und NADH

GLC-Gehalt und -Verbrauch, sowie G6P-Konzentration in der Muskelsuspension und ph-Wert nach anaerob und aerober Inkubation (1 Std., 22°C) mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC und verschiedenen Zusätzen, die das Potential des NADH-NAD⁺-Systems negativieren, in Phosphatpuffer (ph = 7,3) bei 22°C. (Mittelwerte aus 3 bis 7 Exp.)

GLC-Gehalt zu Inkubationsbeginn: 17,69 $\mu\text{mol/g}$ Muskel (= präformierte + zugesetzte Menge)

Versuchsbedingungen		ph ⁺⁾	GLC-Verbrauch				ph nach Inkubation
Inkubation	Zusätze		GLC $\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	in % des Vak.-Verbrauchs	G6P' $\times 10^{-3}\text{M}$	
anaerob	$4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC	7,3	10,96	6,73	100,0	0,14	6,81
	$4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC		17,49	0,21	3,1	0,58	7,06
aerob	$4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal		11,59	6,10	90,6	0,11	6,99
	$4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC $6 \cdot 10^{-3}$ M NADH		15,38	2,31	34,3	0,35	7,13
	$4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC $1 \cdot 10^{-2}$ M NADH		8,18	9,52	141,5	0,18	7,35

+) ph-Wert des Phosphatpuffers

Wie Tab. 10 zu entnehmen ist, haben die Fragmente nach 60 Minuten anaerober und aerober Inkubation mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC in alkalisiertem Phosphatpuffer von 17,69 $\mu\text{mol GLC/g}$ Muskel, die zu Inkubationsbeginn gegeben sind, im Vakuum 6,73 $\mu\text{mol/g}$ und unter Sauerstoff 0,21 $\mu\text{mol/g}$ metabolisiert. Der aerobe Glucoseverbrauch beträgt demnach nur 3,1% des anaeroben Schwunds.

Dieser Befund weist auf eine fast vollständige aerobe Hemmung der HK-Reaktion hin. Da in dem aeroben Experiment alkalischere Bedingungen als in dem Vakuumversuch herrschen (Tab. 10), ist eine ph-Wirkung als Ursache der unterschiedlichen Geschwindigkeit der GLC-Phosphorylierung auszuschließen.

Die aerobe Hemmung der HK-Reaktion ist so stark wie die der Glykogenphosphorolyse (59,60) und bedeutend stärker als diejenige der PFK-Reaktion (Tab. 2). Im Rahmen des Pasteur-Geschehens werden also in den Muskelfragmenten unter Sauerstoff diejenigen Reaktionen fast vollständig blockiert, die Substrat in das glykolytische System einschleusen.

Redoxabhängigkeit der Hexokinase-Reaktion

Die HK-Reaktion verhält sich gegenüber Potentialänderungen des NADH-NAD^+ -Systems wie die Glykogenphosphorolyse (63) und die PFK-Reaktion (Tab. 2, Tab. 4, Abb. 4). Nach einstündiger aerober Inkubation der Fragmente mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC und $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal in alkalisiertem Phosphatpuffer ist fast so viel Glucose verschwunden wie im anaeroben Versuch in Abwesenheit von Amytal (Tab. 10). Wie ein Vergleich der ph-Werte nach aerober Inkubation mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC in An- und Abwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal (Tab. 10) zeigt, läßt sich die Beseitigung des Pasteur-Effekts in Gegenwart des Barbiturats nicht als ph-Wirkung erklären, denn die Ent-hemmung tritt in dem sauereren Inkubationsmilieu ein. Daß die Beschleunigung der GLC-Phosphorylierung durch Amytal auf eine Zunahme der Reduktionskraft des NADH-NAD^+ -Systems zurückgeht, weisen die folgenden Experimente nach. Die Muskelfragmente werden in dem alkalisierten Phosphatpuffer suspendiert und mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC, sowie $6 \cdot 10^{-3}$ M NADH, beziehungsweise $1 \cdot 10^{-2}$ M NADH 60 Minuten unter Sauerstoff inkubiert. In der Erhöhung des GLC-Verbrauchs (Tab. 10) äußert

sich eine Enthemmung der HK-Reaktion, deren Grad von der Konzentration des zugegebenen NADH abhängt. Nach Zusatz von 10^{-2} M NADH und $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC metabolisieren die Fragmente aerob mehr Glucose als in dem Vakuumversuch, in dem Glucose allein angeboten wird (Tab. 10). Hier scheint ein alkalischer Effekt von NADH, der ein Absinken des pH-Werts verhindert (Tab. 10), die Potentialwirkung des NADH-NAD^+ -Systems zu verstärken.

Hexokinase-Reaktion und Effektoren

Wie die bisherigen Versuchsergebnisse nachweisen, verursachen Effektoren in den Muskelfaserfragmenten den Pasteur-Effekt weder auf der Stufe der Glykogenphosphorolyse (61) noch auf derjenigen der F6P-Phosphorylierung (Tab. 5, Tab. 6, Abb. 5b, Abb. 6). Es ist deswegen unwahrscheinlich, daß sich die aerobe Hemmung der GLC-Phosphorylierung und ihre Beseitigung bei negativiertem NADH-NAD^+ -Potential (Tab. 10) auf effektorische Wirkungen zurückführen lassen. Die Effektoren, die auf der Basis der Ergebnisse der Literatur einen Pasteur-Effekt an der HK-Reaktion auslösen könnten, sind der Inhibitor G6P (33,34) und der Deinhibitor anorganisches Phosphat (36). Die intrazellulären G6P-Konzentrationen in den mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC inkubierten Fragmenten (Tab. 10) liegen in einer Größenordnung, in der bei in-vitro-Versuchen Hemmeffekte auftreten. K. Uyeda und E. Racker (37) finden in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-4}$ M G6P und in Abwesenheit von anorganischem Phosphat eine 37%ige Hemmung einer gereinigten Ascites-Tumor-HK, die in Anwesenheit von $1 \cdot 10^{-2}$ M Phosphat auf 9% sinkt. Im Hinblick auf diese Ergebnisse besteht die Möglichkeit, daß das den Fragmenten zugesetzte Phosphat, das die intrazelluläre Konzentration um $2,8 \cdot 10^{-2}$ M erhöht, die inhibitorische Wirkung von G6P verhindert. Sieht man von dieser Möglichkeit ab, so ließe sich die Geschwindigkeit der GLC-Phosphorylierung in den einzelnen Inkubationsversuchen auf

die G6P-Konzentration beziehen, falls die Affinität der HK in den Muskelfragmenten gegenüber G6P mit derjenigen des gereinigten Enzyms aus Ascites Tumor übereinstimmen sollte. Da Unterschieden im GLC-Verbrauch der Fragmente nur relativ geringe Differenzen der G6P-Konzentrationen gegenüberstehen (Tab. 10), müßte man fordern, daß der Inhibitor G6P Trigger-Eigenschaften besitzt. Die Richtigkeit dieser Annahme ist allerdings sehr unwahrscheinlich, denn, wie bereits ausführlich erläutert wurde, beeinflussen andere Effektoren, deren Wirksamkeit in vitro derjenigen von G6P entspricht, Enzymaktivitäten in den Muskelfragmenten erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen. In diesem Zusammenhang sei nochmals darauf verwiesen, daß sich nach den Messungen K. Uyeda und E. Rackers (37) die Ascites-Tumor-HK aus Rohextrakt weniger empfindlich gegenüber G6P als das gereinigte Enzym verhält.

In Abb. 9 ist der Glucose-Verbrauch, der die HK-Reaktionsgeschwindigkeit anzeigt, als Funktion der G6P-Konzentration dargestellt. Die Werte sind Tab. 10 entnommen. Daß die Kurve in ihrem Anfangsteil bis zu einem Maximum steigt, läßt sich durch effektorische Mechanismen nicht erklären.

Im Hinblick auf diesen Verlauf der Kurve, die hohen Phosphatkonzentrationen, die in allen Experimenten durch Zusatz gegeben sind, und die Infragestellung effektorischer Trigger-Eigenschaften in früheren Versuchen erscheint es berechtigt, eine effektorische Beteiligung am Pasteur-Geschehen der HK-Reaktion in den Muskelfragmenten auszuschließen.

Hexokinase-Reaktion und glykolytische ATP-Synthese

Auch bei der Untersuchung der Hexokinase-Reaktion in den Muskelfaserfragmenten stellt sich die Frage, ob die aerobe Hemmung dieser Reaktion auf ein Absinken der ATP-Konzentration am Enzymort zurückzuführen ist.

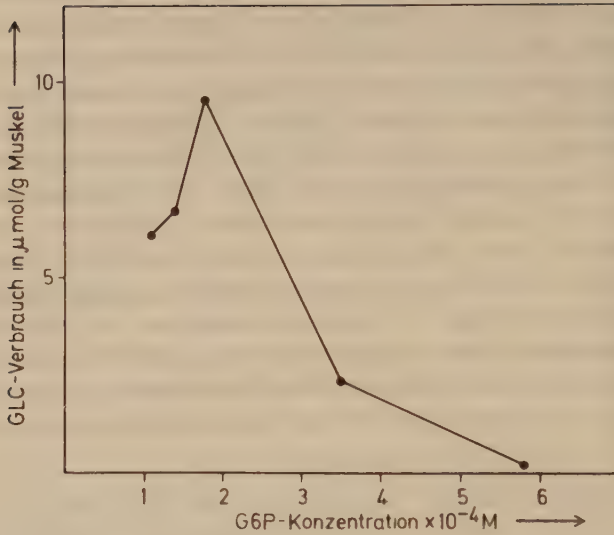


Abb. 9: GLC-Verbrauch des Muskels als Funktion der G6P-Konzentration

GLC-Verbrauch und G6P-Konzentration nach 1 Std. Inkubation in Phosphatpuffer (ph = 7,3) bei 22°C mit $4,7 \cdot 10^{-3}$ M GLC in Gegenwart und Abwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M Amytal, $6 \cdot 10^{-3}$ M NADH und 10^{-2} M NADH (s. Tab. 10).

Eine wesentliche Bedingung für einen solchen Mechanismus ist nach F. Lynen (20) eine cytoplasmatische Verarmung an ADP und anorganischem Phosphat und eine daraus folgende Abnahme der glykolytischen ATP-Syntheserate unter Sauerstoff.

Wie bereits die Beschäftigung mit der PFK-Reaktion ergeben hat (S. 74), besitzt diese Voraussetzung für die Muskelfaserfragmente keine Gültigkeit. Anorganisches Phosphat wird in allen Versuchen zugesetzt und gelangt nach den kinetischen Messungen E. Meyers (60) in den cytoplasmatischen Raum. Eine Limitierung der glykolytischen ATP-Syntheserate unter aeroben Bedingungen durch ADP besteht in den Muskelfaserfragmenten ebenfalls nicht; denn andernfalls wäre der hohe Substratdurchsatz der Pyruvatkinase-Reaktion (Tab. 8, Abb. 7) bei wirksamer Atmungsphosphorylierung (Abb. 8) unverständlich.

Es ist demnach nicht möglich, den Pasteur-Effekt auf der Stufe der Glucose-Phosphorylierung in den Muskelfaserfragmenten durch einen ATP-Mangel im Sinne der Theorie F.

Lynens (20) zu erklären.

Da außerdem die aerobe Hemmung der Hexokinase-Reaktion und ihre Beseitigung nicht auf der Basis effektorischer Mechanismen gedeutet werden können, wird eine unmittelbare Funktionsbeziehung zwischen NADH-NAD^+ -Potential und Hexokinase-Aktivität postuliert.

DISKUSSION

Wie in Hefe (20), Rattenherz (11), Nierenrinde der Ratte (9) und anderen Geweben findet man auch in Muskelfaserfragmenten, die aus Rindsmuskel hergestellt werden, einen Pasteur-Effekt auf den Stufen der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion. Es fällt auf, daß in den Muskelfaserfragmenten die Hexokinase-Reaktion nahezu vollständig blockiert ist und sich damit wie die von E. Meyer (59,60) untersuchte Glykogenphosphorolyse verhält, während sich die aerobe Hemmung der Phosphofructokinase-Reaktion als bedeutend schwächer erweist.

Um den Mechanismus des Pasteur-Effekts auf den genannten Reaktionsstufen zu verstehen, ist es notwendig, die Vorstellungen anderer Arbeitsgruppen zu berücksichtigen.

Auf Grund seiner an Hefe gewonnenen Versuchsergebnisse erklärt F. Lynen (20) die Pasteursche Reaktion als Folge einer Konkurrenz von Atmung und Gärung um anorganisches Phosphat und ADP.

Die Atmungsphosphorylierung führt nach seiner Auffassung (20) zu einer Anreicherung von ATP in den Mitochondrien und zu einer Verarmung von anorganischem Phosphat und ADP im Cytoplasma. Dementsprechend sind nach F. Lynen (20) zwei Ursachen unmittelbar für die aerobe Hemmung der Glucose- und Fructose-6-phosphat-Phosphorylierung verantwortlich:

1. die Abnahme der glykolytischen ATP-Syntheserate unter Sauerstoff, die durch Mangel an ADP und anorganischem Phosphat im Cytoplasma hervorgerufen wird;
2. Strukturfaktoren, die nur eine langsame Diffusion von ATP aus den Mitochondrien an den Ort der Hexokinase zulassen und die eine Diffusion von ATP an den Ort der Phosphofructokinase verhindern.

Diese Theorie eines Pasteur-Effekts ist auf die Verhältnisse der Muskelfaserfragmente deswegen nicht übertragbar, weil in den Muskelfaserfragmenten unter Sauerstoffbedingungen sowohl anorganisches Phosphat als auch ADP für das glykolytische System verfügbar sind.

Um die Möglichkeit eines Phosphatmangels von vorneherein auszuschließen, wird den Muskelfaserfragmenten in allen Experimenten anorganisches Phosphat in großer Menge zugesetzt. Daß das zugegebene Phosphat in den cytoplasmatischen Raum gelangt, beweisen kinetische Messungen E. Meyers (60). Die Beobachtung der Pyruvatkinase-Reaktion führt zu Ergebnissen, welche die Verfügbarkeit von ADP für das glykolytische System der Muskelfaserfragmente auch unter aeroben Bedingungen nachweisen. Die Pyruvatkinase-Reaktion, die ADP als Cosubstrat benötigt, metabolisiert in den Muskelfaserfragmenten unter Sauerstoff bei intakter Atmungsphosphorylierung zugesetztes Phosphoenolpyruvat in großer Menge zu Pyruvat und Lactat. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu der Annahme eines wirksamen ADP-Mangels am Ort der Pyruvatkinase unter aeroben Bedingungen. Die Vorstellungen F. Lynens (20) erklären also nicht den Mechanismus des Pasteur-Effekts auf den Stufen der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion in den Muskelfaserfragmenten. Allerdings widerlegen die Experimente der vorliegenden Arbeit keinesfalls die Gültigkeit der Theorie F. Lynens (20) für die Verhältnisse in Hefe.

In den letzten Jahren wird von vielen Arbeitsgruppen die Möglichkeit diskutiert, den Pasteur-Effekt als Folge effektorischer Wirkungen zu deuten. So nennen zum Beispiel O.H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger und D.W. Schulz (1), J.V. Passonneau und O.H. Lowry (42), sowie A. Parmeggiani und R.H. Bowman (41) zahlreiche experimentelle Daten, welche die Auffassung eines durch Effektoren ausgelösten Pasteur-Effekts stützen. Auch diese Vorstellungen wurden bei den Versuchen mit Muskelfaserfragmenten beachtet.

Der qualitative Nachweis der Wirksamkeit von Effektoren in den Muskelfaserfragmenten gelingt ohne weiteres. AMP und Citrat beeinflussen die Fructose-6-phosphat-Phosphorylierung qualitativ so, wie es nach den Ergebnissen J.V. Passonneaus und O.H. Lowrys (42), sowie A. Parmeggianis und R.H. Bowmans (41) zu erwarten ist. So führt ein Zusatz des Phosphofructokinase-Inhibitors Citrat unter anaeroben Bedingungen zu einer Anreicherung von Hexose-6-phosphat. Um einen deutlichen Effekt in den Muskelfaserfragmenten zu erzielen, muß man allerdings Citrat in einer Konzentration einsetzen, die weit über dem in vitro gefundenen K_i -Wert (81) liegt (Tab. 5). Dieser Befund erinnert an Ergebnisse P. Özands, H.T. Naraharas und C.F. Coris (53), die in vivo eine bedeutend geringere Affinität von Glucose und Glucose-6-phosphat gegenüber Froschsartorius-Hexokinase als in vitro finden.

Wenn man die Möglichkeit einer in vitro und in vivo verschiedenen Affinität zwischen Effektoren und Enzymen außer acht läßt und die Effektorenkonzentrationen nach anaerober und aerober Inkubation der Muskelfaserfragmente vergleicht, so ist es durchaus möglich, die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion auf effektorische Wirkungen zu beziehen.

In diesem Zusammenhang sind aber auch Sauerstoffversuche zu berücksichtigen, in denen der Pasteur-Effekt verschwunden ist.

Wie die von E. Meyer (63) untersuchte Glykogenphosphorylyse zeigen Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion unter aeroben Bedingungen einen hohen Substratdurchsatz, wenn sich durch experimentelle Eingriffe in den Muskelfaserfragmenten eine Negativierung des cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Potentials einstellt. Eine Beseitigung des Pasteur-Effekts gelingt dementsprechend durch NADH-Zu- satz, durch die Blockierung der mitochondrialen NADH-Oxidation mit 5.5.-Isoamyl-äthyl-barbitursäure (Amytal)

und durch die Hemmung des von H. Zebe, A. Delbrück und T. Bücher (67) formulierten α Glycerophosphatzyklus mit Hilfe eines α Glycerophosphatzusatzes. Daß in den mit Amytal und α Glycerophosphat inkubierten Muskelfaserfragmenten tatsächlich eine Negativierung des NADH-NAD^+ -Potentials im Cytoplasma auftritt, wird nach einem Vorschlag T. Büchers und M. Klingenberg's (45) durch Messung der Lactat-Pyruvat-Quotienten bestätigt. Inkubiert man beispielsweise die Muskelfaserfragmente anaerob mit AMP, sowie aerob mit AMP in Gegenwart und Abwesenheit von Amytal und α Glycerophosphat, so findet man Unterschiede der Phosphofructokinase-Reaktionsgeschwindigkeiten, die erstaunlich genau Änderungen der Lactat-Pyruvat-Quotienten entsprechen (Abb. 4).

In den Experimenten, in denen ein Pasteur-Effekt auftritt, und in denjenigen, in denen er verschwindet, werden auch die Effektorenkonzentrationen bestimmt. Wie sich bei einem Vergleich der Meßdaten herausstellt, besteht insgesamt keine Korrelation zwischen Konzentrationsänderungen der Effektoren und Hexokinase-, beziehungsweise Phosphofructokinase-Reaktionsgeschwindigkeiten (Abb. 5b, Abb. 9). Lediglich die Untersuchung der Fructose-6-phosphat-Phosphorylierung in den Muskelfaserfragmenten ergibt eine Korrelation zwischen der Phosphofructokinase-Reaktionsgeschwindigkeit und dem Fructose-1.6-diphosphat-Citrat-Quotienten. Eine gezielte Erhöhung dieses Quotienten mindert allerdings die aerobe Hemmung der Phosphofructokinase-Reaktion nur geringfügig (Tab. 6).

Es muß darauf hingewiesen werden, daß sich experimentelle Widersprüche zu der Theorie einer Auslösung des Pasteur-Effekts durch Effektoren erst dann gezeigt haben, als der Versuch unternommen wurde, den Pasteur-Effekt aktiv in demselben biologischen System zu beseitigen, in dem er zuvor nachgewiesen wurde. Dieses experimentelle Vorgehen

unterscheidet sich wesentlich von demjenigen anderer Autoren. So versuchen J.V. Passonneau und O.H. Lowry (42), ihre Deutung des metabolischen Verhaltens in der aerob-anaeroben Übergangsphase in Mäusehirn mit Hilfe eines zusammengesetzten Systems aus gereinigter Phosphofructokinase und Effektoren zu bestätigen. Das ist deswegen problematisch, weil es nach den Experimenten P. Özands, H.T. Naraharas und C.F. Coris (53) nicht ohne weiteres möglich ist, kinetische Meßergebnisse, die in vitro an gereinigten Enzymen gewonnen werden, auf die in-vivo-Verhältnisse zu übertragen. Diese Problematik wird in den Versuchen mit Muskelfaserfragmenten ausgeklammert. Das biologische System der aufgeschnittenen Muskelfasern ist nach dem histologischen Befund (60) strukturell weitgehend intakt; andererseits besitzt es keine experimentell störenden Permeabilitätsschranken zwischen Inkubationsmilieu und Zelle.

Nach den Resultaten der vorliegenden Arbeit ist es also nicht möglich, den Pasteur-Effekt auf den Stufen der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion und seine Beseitigung in den Muskelfaserfragmenten mit Hilfe der Theorie F. Lynens (20) oder auf der Basis effektorischer Mechanismen zu erklären.

Es finden sich dagegen keine experimentellen Widersprüche, wenn man die Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktionsgeschwindigkeiten als Funktion des cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Potentials darstellt und somit den Pasteur-Effekt auf diesen glykolytischen Reaktionsstufen als Redoxphänomen deutet. Im Rahmen dieser Deutung wird postuliert, daß zwischen der Aktivität der Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase einerseits und dem NADH-NAD^+ -Redoxpaar andererseits eine unmittelbare Funktionsbeziehung besteht.

R. Wagner (86) hat auf die Möglichkeit hingewiesen, den Pasteur-Effekt als Bestandteil eines Regelkreises aufzu-

fassen. Es soll hier versucht werden, die kybernetische Interpretation auf der Basis der dargestellten Ergebnisse zu intensivieren. Als konstant zu erhaltende Regelgröße wollen wir den Wirkgrad der energetischen Glykogen- und Glucoseverwertung annehmen. Die Zelle versucht, möglichst viele Moleküle ATP aus einem Molekül Glucose zu gewinnen. Unter Beteiligung der Atmung liefert der völlige Abbau eines Glucosemoleküls zu H_2O und CO_2 in der Bilanz 38 Moleküle ATP. Diese Zahl 38 gibt den optimalen Wirkgrad, den Sollwert des Regelkreises an, wenn man den Glucoseabbau als Berechnungsgrundlage verwendet. Nach Ausschaltung der Atmung weicht der Istwert maximal vom Sollwert ab, denn anaerob entstehen durch die glykolytische Metabolisierung eines Moleküls Glucose zu Milchsäure in der Bilanz nur zwei ATP-Moleküle. Jeder Vorgang, der die Zelle in einen hypoxischen oder gar anoxischen Zustand bringt, wirkt somit als Störgröße.

Eine solche Störung kann z.B. die Muskelkontraktion darstellen. Nach Messungen von B. Chance und C.M. Connelly (29) steigt in den Sarkosomen nach einer Muskelkontraktion die ADP-Konzentration an; zugleich wird das $NADH-NAD^+$ -Potential positiviert. Dieser Befund deutet auf eine Steigerung der Atmungsaktivität nach der Kontraktion hin. Denn wie B. Chance und G.R. Williams (30) nachweisen, äußert sich eine ADP-Aktivierung der Atmung in einer Positivierung des $NADH-NAD^+$ -Potentials. Da sich eine Atmungsaktivierung in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch auswirkt, dürfte eine Muskelkontraktion das Auftreten einer Hypoxie erleichtern.

Eine Abweichung vom Sollwert, also eine Verminderung des Wirkgrades der energetischen Glykogen- und Glucoseverwertung, wird von dem Fühler des Regelkreises, dem mitochondrialen $NADH-NAD^+$ -Potential, registriert. Die Messung erfolgt in der Dimension der elektrischen Spannung. Der

Schwankungsbereich der Meßwerte ist durch die Differenz des aeroben und anaeroben Redoxpotentials des NADH-NAD^+ -Systems gegeben und liegt nach den NADH-NAD^+ -, beziehungsweise Lactat-Pyruvat-Quotienten, die in den Muskelfragmenten gefunden werden (62) (Tab. 4, Abb. 4), in der Größenordnung von 18 bis 26 mV. Die Übermittlung des gemessenen Istwerts an den cytoplasmatischen Regler, den die Aktivitätszustände von Hexokinase und Phosphorylase-System repräsentieren, geschieht über Wasserstoffzyklen der Art des α -Glycerophosphatzyklus. Je nach der Größe des Istwerts öffnet der Regler durch Enzymaktivierung die glykolytischen Substratschleusen Glykogenphosphorolyse und Hexokinase-Reaktion. In der Beantwortung der Atmungs- hemmung durch eine Glykolyseaktivierung äußert sich eine Vorzeichenumkehr zwischen ein- und ausgehender Meldung. Das Einsetzen einer aktiven Glykolyse führt, wie O. H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger und D.W. Schulz (1) zeigen, in wenigen Sekunden zu einer Anreicherung von Fructosediphosphat und seinen glykolytischen Folgeprodukten. Dadurch wird zweierlei erreicht:

1. Glykolytisch entstehende saure Intermediärstoffe wie Milchsäure dienen als Signale des Reglers an den Stellmotor, dessen Funktion in diesem Regelkreis die Kapillärwände übernehmen (86). Durch Kapillareröffnung, beziehungsweise -erweiterung erhöht der Stellmotor die Durchblutungsgröße (86), beseitigt die störende Hypoxie oder Anoxie und kontrolliert somit in der Folge, dem Prinzip der Rückkopplung entsprechend, die an ihn gerichtete Signalgebung des Reglers. Als Resultat tritt Pasteur-Effekt auf.
2. Durch die Anhäufung glykolytischer Metaboliten "unterhalb" der durch das Pasteur-Geschehen betroffenen Reaktionen wird in der hypoxischen oder anoxischen Phase vorsorglich für dieiedereinsetzende Atmung Substrat im Überschuß bereitgestellt.

Bei der kybernetischen Deutung des Pasteur-Geschehens wurde bisher der Befund der aeroben Hemmung der Phosphofructokinase-Reaktion (Tab. 2) nicht berücksichtigt. Wenn man von Ergebnissen der Versuche mit Muskelfragmenten ausgeht (59,60) (Tab. 10), scheint es so zu sein, daß die aerob fast völlig blockierten, einschleusenden Reaktionen, die Glykogenphosphorolyse und Hexokinase-Reaktion, die Beschickung der Glykolyse mit Substrat kontrollieren, während die aerob nur schwach gehemmte Phosphofructokinase-Reaktion in dieser Hinsicht eine untergeordnete Rolle spielt. Es ist aber denkbar, daß der Pasteur-Effekt auf der Stufe der Fructose-6-phosphat-Phosphorylierung in andere regulative Vorgänge der Zelle eingreift. So könnte er nach einer durch die Hormone Adrenalin und Glucagon bedingten Glykogenmobilisierung (48,49) durch Anheben des Glucose-6-phosphat-Spiegels die Metabolisierung in glykolytische Seitenwege erleichtern, und die Freisetzung von Glucose aus Glucose-6-phosphat durch Glucose-6-phosphatase oder die Bildung von 6-Phosphogluconat und Pentosephosphat fördern.

Der Vorrang der Selbstregulation wäre durch die Gleichschaltung der PFK-Reaktion mit dem Regler, durch ihre gemeinsame Abhängigkeit von dem übertragenen Istwert gesichert.

ZUSAMMENFASSUNG

Frühere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe behandeln vorwiegend den Mechanismus des Pasteur-Effekts im Bereich der Glykogenphosphorolyse (24,59,60,61,62,63,64).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit weiteren Angriffsorten des Pasteur-Effekts im glykolytischen System und dem Mechanismus der gefundenen aeroben Hemmungen.

Als Versuchsmaterial dienen Muskelfaserfragmente, die mit Hilfe eines Fleischwolfs aus Stiernackemuskel hergestellt werden. Diese Muskelfaserfragmente werden in Phosphatpuffer suspendiert und in Langzeitversuchen in Gegenwart und Abwesenheit von molekularem Sauerstoff mit verschiedenen niedermolekularen Stoffen inkubiert. Die Experimente führen zu den folgenden Ergebnissen:

1. Die Muskelfaserfragmente metabolisieren die in grosser Menge zugesetzten Substanzen Glucose, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1.6-diphosphat, 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Adenosin-3'-monophosphat zu einem hohen Prozentsatz. Demnach bestehen für die genannten Stoffe zwischen Inkubationsmilieu und Zellfragmenten keine Permeabilitätsschranken.
2. Als Angriffsorte des Pasteur-Effekts werden die Hexokinase- und die Phosphofructokinase-Reaktion nachgewiesen. Während die aerobe Hemmung der Hexokinase-Reaktion sehr stark ist, erweist sich diejenige der Phosphofructokinase-Reaktion als relativ gering.
3. Der Pasteur-Effekt auf den Stufen der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion läßt sich durch experimentelle Maßnahmen beseitigen, die zu einer Erhöhung

des cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Quotienten führen. Diese Maßnahmen bestehen in der Hemmung des α Glycerophosphatzyklus durch α Glycerophosphat-Zusatz, in der Blockierung der mitochondrialen NADH-Oxidation durch 5.5-Isoamyl-äthyl-barbitursäure (Amytal) und in einem Zusatz verschiedener NADH-Mengen.

Daß in Gegenwart von Amytal und α Glycerophosphat unter aeroben Bedingungen eine Negativierung des cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Potentials stattfindet, bestätigen die Lactat-Pyruvat-Quotienten, die als Kontrollparameter dienen.

4. Die Pyruvatkinase-Reaktion zeigt unter Sauerstoff einen hohen Substratdurchsatz. Demnach ist Adenosindiphosphat in Muskelfaserfragmenten auch unter aeroben Bedingungen für das glykolytische System verfügbar.

Da in allen Experimenten mit einem Phosphatpuffer gearbeitet wird, kann anorganisches Phosphat ebenfalls keine limitierende Rolle spielen. Deswegen ist es nicht möglich, die aerobe Hemmung der ATP benötigten Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion auf eine verminderte glykolytische ATP-Syntheserate zurückzuführen.

5. Die Effektoren AMP, Fructose-1.6-diphosphat und Citrat besitzen in den Muskelfaserfragmenten keine Trigger-Eigenschaften. Sie beeinflussen die Phosphofructokinase-Aktivität erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen.

Die aerobe Enthemmung der Phosphofructokinase- und Hexokinase-Reaktion bei negativiertem cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Potential wird nicht durch Effektoren vermittelt.

Im Hinblick auf die genannten Ergebnisse wird die Abhängigkeit der Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktionsgeschwindigkeit vom cytoplasmatischen NADH-NAD^+ -Potential als Redoxbeziehung zwischen NADH-NAD^+ -Paar und Aktivität der Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase gedeutet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. O.H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger, and D.W. Schulz: J. B. C. 239, 18 (1964)
2. J.R. Williamson: J. B. C. 241, 5026 (1966)
3. O. Warburg: Biochem. Z. 172, 432 (1926)
4. L. Pasteur: Bull. Soc. Chim., Paris 28 VI, p. 79 (1861)
5. O. Meyerhof: Biochem. Z. 162, 43 (1925)
6. O. Meyerhof, K. Lohmann und R. Meier: Biochem. Z. 157, 459 (1925)
7. A. Hahn, E. Fischbach und H. Niemer: Z. Biol. 91, 53 (1930)
8. W. Kutscher und M. Hasenfuß: Z. Physiol. Chem. 265, 181 (1940)
9. R. Wu: B. B. R. C. 14, 79 (1964)
10. O. Warburg: Colloquium Ges. Physiol. Chem., Mosbach 17, 1 (1966)
11. D.M. Regen, W.W. Davis, H.E. Morgan, and C.R. Park: J.B.C. 239, 43 (1964)
12. O. Warburg: Biochem. Z. 177, 471 (1926)
13. W. Kutscher und W. Sarreither: Z. Physiol. Chem. 265, 152 (1940)
14. A.C. Aisenberg, B. Reinafarje, and v.R. Potter: J. B. C. 224, 1099 (1957)
15. A.C. Aisenberg, and v.R. Potter: J.B.C. 224, 1115 (1957)
16. F. Lynen: Liebigs Ann. Chem. 546, 120 (1941)
17. F. Lynen: Naturwiss. 30, 398 (1942)
18. M.J. Johnson: Science 94, 200 (1941)
19. F. Lynen und R. Koenigsberger: Liebigs Ann. Chem. 573, 60 (1951)
20. F. Lynen: Colloquium Ges. Physiol. Chem., Mosbach 8, 155 (1957)

21. A. Harden, and W.I. Young: J. Chem. Soc. (London) 87, I, 189 (1905)
22. O. Warburg und W. Christian: Biochem. Z. 303, 40 (1939)
23. B. Hess, and B. Chance: J. B. C. 236, 239 (1961)
24. E. Meyer und B. v. Bock: (in publice)
25. B. Chance, and B. Hess: Science 129, 700 (1959)
26. B. Chance: in Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism (J. & A. Churchill LTD., London) p. 91 (1959)
27. B. Chance, and G.R. Williams: J.B.C. 217, 383 (1955)
28. B. Chance: Science 120, 767 (1954)
29. B. Chance, and C.M. Connelly: Nature 179, 1235 (1957)
30. B. Chance, and G.R. Williams: Advances in Enzymol. 17, 65 (1956)
31. v.R. Potter: in Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism (J. & A. Churchill LTD., London) p. 273 (1959)
32. P. Siekevitz, and v.R. Potter: J.B.C. 215, 221 (1955)
33. H. Weil-Malherbe, and A.D. Bone: Biochem. J. 49, 339 (1951)
34. R.K. Crane, and A. Sols: J.B.C. 210, 597 (1954)
35. A. Sols, and R.K. Crane: J.B.C. 206, 925 (1954)
36. I.A. Rose, J.V.B. Warms, and E.L. O'Connell: B.B.R.C. 15, 33 (1964)
37. K. Uyeda, and E. Racker: J.B.C. 240, 4682 (1965)
38. H.E. Morgan, and A. Parmeggiani: J.B.C. 239, 2440 (1964)
39. S.E. Kahana, O.H. Lowry, D.W. Schulz, J.V. Passonneau, and E.J. Crawford: J.B.C. 235, 2178 (1960)
40. H.A. Lardy, and R.E. Parks jr.: in O.H. Gaebler "Enzymes: units of biological structure and function", Academic Press, Inc., New York, p. 584 (1956)
41. A. Parmeggiani, and R.H. Bowman: B.B.R.C. 12, 268 (1963)

42. J.V. Passonneau, and O.H. Lowry: B.B.R.C. 7, 10 (1962)
43. J.V. Passonneau, and O.H. Lowry: Advances in Enz. Regul. 2, 265 (1964)
44. P. Eyer, and D. Pette: Life Sciences 6, 191 (1967)
45. T. Bücher und M. Klingenberg: Angew. Chem. 70, 552 (1958)
46. W.C. Schneider, M.J. Striebich, and G.H. Hogeboom: J.B.C. 222, 969 (1956)
47. N.D. Goldberg, J.V. Passonneau, and O.H. Lowry: J.B.C. 241, 3997 (1966)
48. E.W. Sutherland, and T.W. Rall: J.B.C. 232, 1077 (1958)
49. J.B. Posner, R. Stern, and E.G. Krebs: B.B.R.C. 9, 293 (1962)
50. E. Meyer und G. Seidel: Z. Physiol. Chem. 328, 262 (1962)
51. E. Vinuela, M.L. Salas, M. Salas, and A. Sols: B.B.R.C. 15, 243 (1964)
52. G.T. Cori, and C.F. Cori: J.B.C. 158, 321 (1945)
53. P. Özand, H.T. Narahara, and C.F. Cori: J.B.C. 237, 3037 (1962)
54. R. Höber: Physikalische Chemie d. Zellen
U. Gewebe, Stämpfli-Verlag, Bern 1947
55. G. Hevesy: J. chem. Soc. (London) 312, 1218 (1939)
56. W. Kutscher, G. Keith und W. Sarreither: Z. Physiol. Chem. 251, 129 (1938)
57. W. Kutscher und W. Sarreither: Z. Physiol. Chem. 265, 152 (1940)
58. A. Hahn, E. Fischbach und H. Niemer: Z. Biol. 91, 53 (1930)
59. E. Meyer: Angew. Chem. 70, 82 (1958)
60. E. Meyer, P.M. Reisert und B. v. Kuhenheim: Z. Physiol. Chem. 332, 143 (1963)
61. E. Meyer: (in publice)
62. E. Meyer: (in publice)
63. E. Meyer: (in publice)
64. E. Meyer: (in publice)

65. F. Lipmann: Biochem. Z. 265, 133 (1933)
66. A.L. Lehninger, J.B.C. 190, 345 (1951)
67. H. Zebe, A. Delbrück und T. Bücher: Angew. Chem. 69, 65 (1957)
68. T.M. Devlin, and B.H. Bedell: B.B.A. 36, 564 (1959)
69. O. Warburg: in "Wasserstoffübertragende Fermente" Verlag Dr. W. Saenger, Berlin, 1948
70. T. Bücher, W. Luh und D. Pette: im Handbuch der physiol.- und patholog.-chem. Analyse, Hoppe-Seyler/Thierfelder 10. Aufl. VI/A 292 (1964)
71. H.U. Bergmeyer: in "Methoden der enzymatischen Analyse" Verlag Chemie, Weinheim, 1962
72. H.J. Hohorst; Biochem. Z. 328, 509 (1956)
73. G. Beisenherz, T. Bücher, and K.H. Garbade: in S.P. Colowick, N.O. Kaplan "Methods in Enzymology", Academic Press, New York, I, 391 (1955)
74. W. Gruber und H. Moellering: Biochem. Z. 346, 85 (1966)
75. B. Hess: in "Control Mechanisms in Respiration and Fermentation", B. Wright, ed., The Ronald Press Company 17, 333 (1963)
76. P. Karlson: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, G. Thieme Verlag, 1966
77. E. Meyer: (unveröffentlicht)
78. T. Bücher und W. Rüssmann: Angew. Chem. 75, 881 (1963)
79. K. Burton: Ergebn. Physiol., biol. Chem., exp. Pharmakol. 49, 275 (1957)
80. F.L. Rodkey; J.B.C. 213, 777 (1955)
81. J.V. Passonneau, and O.H. Lowry: B.B.R.C. 13, 372 (1963)
82. M.L. Salas, E. Vinuela, M. Salas, and A. Sols: B.B.R.C. 19, 371 (1965)
83. H.A. Lardy, and H. Wellman: J.B.C. 195, 215 (1952)
84. S.P. Colowick: in "The Enzymes", J.B. Sumner and K. Myrback, eds., 2, 114 (1951)

85. R.K. Crane, and A. Sols: in "Methods in Enzymol.",
S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.,
Academic Press Inc., N.Y. 1, 277 (1955)

86. R. Wagner: Progress in Biocybernetics, edited by
N. Wiener and J.P. Schadé 1, 132 (1964)

LEBENS LAUF

Am 20.4.1940 wurde ich als Sohn des Chemikers Dr. phil. nat. Carl-Friedrich Spieß und der Ärztin Dr. med. Else-marie Spieß, geb. Altrogge, in Lüdenscheid geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich in meiner Heimatstadt die Volksschule und anschließend bis zum Abitur 1960 das neusprachliche und mathematisch-naturwissenschaftliche Zeppelin-Gymnasium.

Von April 1960 bis Weihnachten 1961 leistete ich meinen infolge der Berlinkrise verlängerten Wehrdienst ab. Anschließend studierte ich an der Münchener Universität Medizin und bestand dort im Frühjahr 1964 die ärztliche Vorprüfung.

Von November 1964 bis Juli 1967 arbeitete ich in dem unter Leitung von Prof. Dr. Th. Bücher stehenden Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München in der Abteilung von Priv. Doz. Dr. E. Meyer an der vorliegenden Dissertation.

Im Herbst 1968 beendete ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen und begann zugleich an der Universität München ein Chemiestudium.

Den internistischen Teil der Medizinalassistentenzeit leistete ich im Sommer 1969 an der II. Medizinischen Klinik der Universität München ab.

